

Інститут радіофізики та електроніки ім. О. Я. Усикова
Національної академії наук України
Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ГЛИБИЦЬКИЙ ДМИТРО МИХАЙЛОВИЧ

УДК 577.32+544.023.26+004.932.2

ДИСЕРТАЦІЯ

**ТЕКСТУРИ ПЛІВОК БІОПОЛІМЕРНО-СОЛЬОВИХ СИСТЕМ:
КІЛЬКІСНИЙ АНАЛІЗ ПРИ ФІЗИЧНИХ І ХІМІЧНИХ ВПЛИВАХ**

Спеціальність 03.00.02 – біофізика
(фізико-математичні науки)

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата фізико-математичних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

Д.М. Глибицький

Науковий керівник Шестопалова Ганна Вікторівна, доктор фізико-математичних наук, професор.

Харків – 2019

АНОТАЦІЯ

Глибицький Д.М. Текстури плівок біополімерно-сольових систем: кількісний аналіз при фізичних і хімічних впливах. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фізико-математичних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика (фізико-математичні науки). – Інститут радіофізики та електроніки ім. О. Я. Усикова Національної академії наук України; Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України, Харків, 2019.

Дисертаційну роботу присвячено встановленню зв'язку між характеристиками текстур, зокрема, зигзагоподібних патернів, на висушених плівках, отриманих з водно-сольових розчинів біополімерів, та впливом хімічних і фізичних факторів на структурний стан біополімерів.

За результатами дослідження впливу органічних речовин трис(гідроксиметил)амінометану (Трис) і етилендіамінтетраоцтової кислоти (ЕДТО) на формування текстур плівок ДНК встановлено, що розчини Na-ДНК з NaCl при додаванні Трис або ЕДТО не формували текстур на поверхні плівок після висушування, але розчини Na-ДНК з NaCl, Трис і ЕДТО через 40-50 годин після висушування формували текстури, аналогічні текстурам сфероліта. Це може бути пов'язано з повільною рекристалізацією при кімнатних умовах, що обумовлена неповною іммобілізацією ДНК.

Було досліджено ефект заміни NaCl у розчині БСА на KCl та RbCl. Заміна Na^+ на катіони K^+ або Rb^+ не перешкоджає формуванню зигзагоподібних патернів (Z-патернів) на плівках ДНК або бичачого сироваткового альбуміну (БСА), однак площа текстур ДНК при цьому помітно знижується, а площа текстур білка дещо підвищується. Це може бути пов'язано зі збільшенням маси іона та його розміру в ряду Na, K, Rb.

Було досліджено ефект заміни NaCl у розчині БСА на NaF та NaBr. На відміну від Cl^- , аніони Br^- та F^- не створюють умов для формування зигзагоподібних патернів, що свідчить про високу специфічність

зигзагоподібного режиму агрегації до фізичних параметрів аніонів. Порівняно з Cl^- , в розчинах з іонами F^- або Br^- УФ-поглинання зростає, що свідчить про структурні зміни білка, тоді як ефективна інтенсивність флуоресценції знижується. Цей факт вказує на зміни в мікрооточенні триптофану. Оскільки стабільність структури білка впливає на здатність білка до кристалізації, це може слугувати одним з можливих пояснень отриманих результатів. Розрахунки за даними мікрохвильової діелектрометрії також показали, що NaF менш гідратований ніж NaCl та NaBr . Гідратація компонент розчину позначається на характері взаємодій між ними (зокрема, на здатності солі до осаджування білка), що теж може змінювати умови кристалізації білка. Таким чином, отримані результати вперше показують, що однією з основних умов формування зигзагоподібних патернів є наявність Cl^- .

Контрольні експерименти показали, що висушування розчину NaCl без ДНК або білка за розробленою у роботі методикою не призводить до утворення Z-структур, що підтверджує участь біополімерів у формуванні цих патернів.

Було виявлено, що подвоєння концентрації білка та солі призводить до зростання середньої величини та розкиду довжин сегментів Z-патернів порівняно з контрольною концентрацією. Відповідно, більш висока концентрація компонентів дозволяє кристалам рости в одному напрямку протягом більш тривалого часу.

Було проведено дослідження впливу іонів срібла і наночасток срібла на ДНК та текстури плівок ДНК. Порівняно з контролем, розчини з AgNO_3 або наносріблом (НС) формують текстури з меншою площею. Зі зростанням концентрації іонів срібла і НС, УФ поглинання зростає; в зволоженій (92% відносної вологості) плівці ДНК з НС, ІЧ смуга азотистих основ та дезоксирибозна смуга відсутні, а антисиметричні коливання фосфатів зазнають високочастотний зсув. Це говорить про руйнування спіральної структури ДНК. Отримані результати свідчать на користь гіпотези, що

зменшення площі текстур пов'язане з неоднорідністю пошкоджених молекул ДНК, яка послаблює їх здатність до кристалізації.

Було визначено, що додавання CuCl_2 або ZnCl_2 до розчинів ДНК перешкоджає формуванню зигзагоподібних патернів. З іншого боку, додавання CuCl_2 або ZnCl_2 не перешкоджає формуванню інших типів патернів.

Для плівок БСА з NaCl та домішками міді або заліза було показано, що максимум розподілу кількості Z-патернів знаходиться між центром і краями кювети, тоді як фрактальна розмірність текстур не має великої розбіжності між центром і краями для плівок з CuCl_2 , але знижується на краях кювети для плівок з FeCl_3 . Показано, що питома довжина Z-патернів є більш чутливою до впливу FeCl_3 , ніж відносна площа та фрактальна розмірність текстур.

Було проведено аналіз змін у кількості Z-патернів на плівках при додаванні різної кількості FeCl_3 до розчину БСА. При додаванні FeCl_3 до розчину БСА+ NaCl змінюється кількість сегментів зигзагів (L_{count}), але не геометричні параметри зигзагів. Водночас, збільшення концентрації FeCl_3 призводить до переважання інших типів патернів. ζ -потенціал частинок білка зменшується зі збільшенням концентрації FeCl_3 , що є типовим для колоїдних систем проявом екранування поверхневого потенціалу розчином електроліту. Зміна поверхневого потенціалу і розміру частинок впливає на динаміку агрегації частинок у структури на поверхні субстрату; це може призвести до полідисперсності частинок БСА у розчині та погіршення кристалізації. Але оскільки гідроксид заліза також утворює колоїдні частинки, полідисперсність частинок у розчині і погіршення кристалізації не обов'язково пов'язані з агрегацією білка.

При додаванні AlCl_3 до розчинів БСА+ NaCl ζ -потенціал зменшувався, і спостерігалось збільшення розміру частинок, а також ознаки агрегації та седиментації БСА коли ζ -потенціал був близький до нуля. З іншого боку, кількість сегментів зигзагів (L_{count}) знижується при таких концентраціях AlCl_3 , коли ζ -потенціал білка вже змінював знак. Можна припустити, що

ступінь агрегації при менших концентраціях AlCl_3 не є достатньо значною для порушення умов кристалізації.

Був досліджений вплив органічної молекули флавінмононуклеотиду (ФМН) на стан БСА в розчині та на формування Z-патернів. При співвідношенні концентрацій БСА до ФМН як 1:1,3 кількість сегментів Z-патернів (L_{count}) залишається у діапазоні контрольних значень, але зменшується вже при співвідношенні 1:4 і стає нульовою при співвідношенні 1:40. Результати мікрохвильової діелектрометрії свідчать про те, що за наявності ФМН відбувається додаткове зв'язування води. Але більш впливовою причиною порушення умов кристалізації в даному випадку може бути полідисперсність, викликана наявністю самоасоціатів ФМН або неоднорідністю складу розчину.

Було досліджено вплив температури на розчин БСА з NaCl та на текстури отриманих з нього плівок. Було виявлено, що кількість сегментів зигзагів на відповідних плівках знижується при температурі утворення вторинних агрегатів (70 °C) і Z-патерни повністю зникають при температурі утворення агрегатів великих розмірів (80-95 °C). Водночас, середня довжина сегментів (L_{mean}) практично не змінюється. Фрактальна розмірність текстур знижується при 45 °C, і залишається у межах довірчого інтервалу при подальшому нагріванні, що пов'язано з іншими типами патернів на поверхні плівки. Денатурація білка була підтверджена зниженням інтенсивності флуоресценції. Ці результати погоджуються з гіпотезою, що Z-патерни є результатом кристалізації біополімерів, яка стає менш можливою з ростом ступеня агрегації та дисперсності частинок.

Було проведено дослідження впливу ефектів гамма-опромінення розчину БСА з NaCl (зміна вторинної структури, фрагментація, агрегація) у діапазоні доз 0,16-12000 Гр на формування Z-патернів. Порушення структури БСА було підтверджене спектрами УФ-поглинання і флуоресценції. При цьому, середнє значення та розкид діаметру частинок БСА збільшуються з ростом дози опромінення, доки дисперсність частинок не стає надто високою

для вимірювання методом ДРС. Було визначено, що кількість Z-структур на плівці близька до рівня контролю при мінімальній дозі та близька до нуля при максимальній дозі, але варіюється між контрольним та нульовим значеннями для доз у діапазоні 1-2000 Гр. Найбільш ймовірно, цей ефект пов'язаний з дисперсністю молекул білка, яка залишається приблизно на тому ж рівні при зміні вторинної структури та фрагментації молекул білка. Таким чином, вперше показано, що зміна структурного стану біополімеру під дією таких фізичних факторів, як температура або гамма-опромінення, позначається на характеристиках зигзагоподібних патернів.

Аналіз отриманих вперше статистичних розподілів характеристик зигзагоподібних патернів показав, що найбільш інформативними (чутливими до дії досліджуваних чинників) є питома довжина зигзагів (L_{specific}), кількість сегментів зигзагів (L_{count}) та їхня середня довжина (L_{mean}).

Вперше проведене для випадку заповненої розчином кювети чисельне моделювання процесів випаровування рідини та перерозподілу частинок свідчить, що зигзагоподібні патерни формуються у ділянках кювети, де вода швидко видаляється.

Таким чином, у роботі встановлено зв'язок між змінами стану біополімеру у розчині під дією хімічних і фізичних факторів, та змінами кількісних характеристик текстур на плівках, отриманих з цих розчинів. Вперше розроблений метод кількісної характеристики текстур плівок, що базується на аналізі Z-патернів, дає можливість оцінювати агрегаційний стан біополімеру у вихідному розчині, та при подальшому розвитку може бути корисним для розв'язання зворотної задачі – оцінки зміни стану біополімеру за змінами параметрів текстур під дією фізичних і хімічних факторів та молекулярного оточення.

Ключові слова: біополімер, ІЧ спектроскопія, УФ спектроскопія, флуоресцентна спектроскопія, динамічне розсіювання світла, висушена плівка, текстура, зигзагоподібний патерн.

ABSTRACT

Glibitskiy D.M. **Textures of films of biopolymer-salt systems: quantitative analysis of physical and chemical influences.** – Qualification scientific paper, manuscript.

Thesis for a Candidate Degree in Physics and Mathematics, Specialty 03.00.02 – Biophysics (Physics and mathematics). – O. Ya. Usikov Institute for radiophysics and electronics, National Academy of Science of Ukraine; V. N. Karazin Kharkiv National University, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kharkiv, 2019.

The dissertation is devoted to establishing a connection between texture characteristics, in particular, zigzag patterns, on dried films obtained from water-salt solutions of biopolymers, and the influence of chemical and physical factors on the structural state of biopolymers.

The influence of tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) organic substances on the formation of DNA texture patterns was studied. It was found that, after the addition of Tris or EDTA, Na-DNA solutions with NaCl did not form textures on the film surface after drying, but the solutions Na-DNA with NaCl, Tris and EDTA formed textures similar to that of spherulite within 40-50 hours after drying. This may be caused by slow recrystallization at room conditions due to incomplete immobilization of DNA.

The effect of replacing NaCl in a BSA solution with KCl and RbCl was investigated. Replacement of Na^+ with K^+ or Rb^+ cations did not prevent the formation of zigzag patterns (Z-patterns) on DNA or bovine serum albumin (BSA) films; however, the area of DNA textures considerably decreased, and the area of protein textures somewhat increased. This may be due to an increase in the mass and size of the ion in the Na, K, Rb series.

The effect of replacing NaCl in BSA solution with NaF and NaBr was investigated. Br^- and F^- anions, unlike Cl^- , did not create conditions for the formation of zigzag patterns, which indicates the high specificity of the zigzag

aggregation regime to the physical parameters of the anions. Compared to Cl^- , in solutions with F^- or Br^- ions the UV absorption increased, indicating a change in protein structure, whereas the effective fluorescence intensity decreased. This indicates a change in the microenvironment of tryptophan. Since the stability of the structure of the protein affects the ability of the protein to crystallize, this may serve as one of the possible explanations for the results. Calculations based on microwave dielectrometry data also indicated that NaF is less hydrated than NaCl and NaBr. Hydration of the solution components affects the nature of the interactions between them (in particular, the ability of salt to precipitate the protein), which can also change the conditions of protein crystallization. Thus, the obtained results show for the first time that one of the basic conditions for the formation of zigzag patterns is the presence of Cl^- .

Control experiments showed that drying a solution of 20 mM NaCl without DNA or protein, using the method developed in the work, did not lead to the formation of Z-structures, which confirms the participation of biopolymers in the formation of these patterns.

It was found that the doubling of protein and salt concentration led to an increase in the mean value and spread of the lengths of Z-pattern segments compared to the control concentration. Presumably, a higher concentration of components allows crystals to grow in one direction over a longer period of time.

A study of the influence of silver ions and silver nanoparticles on DNA and on the texture of DNA films was carried out. Compared to control, solutions with AgNO_3 or nanosilver (NS) formed textures with smaller area. With increasing concentration of silver ions and NS, UV absorption increased; in a humidified (relative humidity 92%) film of DNA with NS, the infrared band of nitrogenous bases and deoxyribose band were absent, and the antisymmetric oscillations of phosphates underwent a high-frequency shift. This suggests the destruction of the spiral DNA structure. The obtained results are in favor of the hypothesis that the decrease in the texture area is due to the heterogeneity of damaged DNA molecules, which weakens their ability to crystallize.

It was determined that adding CuCl_2 or ZnCl_2 to DNA solutions prevented the formation of zigzag patterns. On the other hand, the addition of CuCl_2 or ZnCl_2 did not prevent the formation of other types of patterns.

For films of BSA with NaCl and copper or iron additives, the maximum of the distribution of the number of Z-patterns was found to be located between the center and the edges of the cell, whereas the fractal dimension of the textures did not have a large discrepancy between the center and the edges for the films with CuCl_2 , but decreased at the edges of the cell for films with FeCl_3 . It was shown that the specific length of Z-patterns is more sensitive to the influence of FeCl_3 than the relative texture area or fractal dimension of the textures.

An analysis of the changes in the number of Z-patterns on films, caused by different FeCl_3 concentrations, was performed. With the addition of FeCl_3 to the BSA+NaCl solution, the number of zigzag segments (L_{count}) changed, but not the geometric parameters of the zigzags. At the same time, an increase in the FeCl_3 concentration led to the predominance of other types of patterns. ζ -potential of the protein particles decreased with increasing FeCl_3 concentration, which is a typical for colloidal systems phenomenon of the screening of surface potential by an electrolyte solution. The change in surface potential and particle size affects the dynamics of aggregation of particles into the structures on the substrate surface; this can lead to an increase in polydispersity of BSA particles in solution and hinder crystallization. But since iron hydroxide also forms colloidal particles, the polydispersity of the particles in solution and the hindering of crystallization are not necessarily related to the aggregation of the protein.

With the addition of AlCl_3 to BSA+NaCl solutions, the ζ -potential decreased and an increase in particle size was observed, as well as signs of BSA aggregation and sedimentation when ζ -potential was close to zero. On the other hand, the number of zigzag segments (L_{count}) decreased at the concentrations of AlCl_3 that corresponded to the sign change in ζ -potential of the protein. Presumably, the degree of aggregation at lower AlCl_3 concentrations is not significant enough to violate the conditions of crystallization.

The effect of an organic molecule flavin mononucleotide (FMN) on the state of BSA in solution and on the formation of Z-patterns was investigated. At the 1:1,3 ratio of BSA to FMN concentrations, the number of segments of Z-patterns (L_{count}) remained in the range of control values, but decreased at the 1:4 ratio and became zero at the 1:40 ratio. The results of microwave dielectrometry indicated that in the presence of FMN additional water binding takes place. But the more influential cause of disruption of crystallization conditions in this case may be the polydispersity caused by the presence of FMN self-associates or the inhomogeneity of the solution composition.

The influence of temperature on BSA+NaCl solutions and on the textures of films obtained from them was investigated. It was found that the number of zigzag segments on the respective films decreased at the temperature of formation of secondary aggregates (70 °C), and the Z-patterns disappeared completely at the temperature of formation of large aggregates (80-95 °C). At the same time, the average length of the segments (L_{mean}) was practically unchanged. The fractal dimension of the textures decreased at 45 °C and remained within the confidence interval with further heating, which can be attributed to the other types of patterns on the film. The denaturation of the protein was confirmed by a decrease in the fluorescence intensity. These results agree with the hypothesis that Z-patterns are the result of biopolymer crystallization, which becomes less viable with the increase in the degree of particle aggregation and dispersity.

A study was carried out on the influence of effects caused by gamma-irradiation of BSA+NaCl solution (change in secondary structure, fragmentation, aggregation) in the dose range of 0.16-12000 Gy on the formation of Z-patterns. Disruption of BSA structure was confirmed by the UV absorption and fluorescence spectra. The mean value and spread of BSA particle diameter increased with the increasing irradiation dose, until particle dispersity became too high for DLS measurements. It was determined that the number of Z-structures on the film was close to the control level at a minimum dose and close to zero at the maximum dose, but varied between the control and zero values for the doses in the 1-2000 Gy

range. Most likely, this effect is associated with the dispersity of protein molecules, which remains approximately at the same level when the secondary structure is altered and the protein molecules are fragmented. Thus, it has been shown for the first time that the change in the structural state of a biopolymer under the influence of physical factors, such as temperature or gamma irradiation, affects the characteristics of zigzag patterns.

The analysis of statistical distributions of zigzag pattern patterns has shown that the most informative (sensitive to the effect of the investigated factors) are the specific length of zigzags (L_{specific}), the number of segments of zigzags (L_{count}) and their mean length (L_{mean}).

The numerical simulation of the processes of liquid evaporation and particle redistribution, conducted for the first time for a square cell filled with liquid, suggests that zigzag patterns are formed in the areas of the cell where water is rapidly removed.

Thus, in this work the connection is established between the changes in the biopolymer state in solution under the influence of chemical and physical factors, and the changes in the quantitative characteristics of textures on films obtained from these solutions. The novel method for numerical characterization of film textures, which is based on the analysis of Z-patterns, allows an estimation of the aggregational state of a biopolymer in the initial solution, and with further development it may be useful for solving the inverse problem: assessing the change in the state of a biopolymer by the changes in the texture parameters, caused by physical and chemical factors and the molecular environment.

Keywords: biopolymer, IR spectroscopy, UV spectroscopy, fluorescence spectroscopy, dynamic light scattering, dried film, texture, zigzag pattern.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Публікації у закордонних наукових фахових виданнях:

1. Glibitskiy G. M., **Glibitskiy D. M.**, Gorobchenko O. A., Nikolov O. T., Roshal A. D., Semenov M. A., Gasan A. I. Textures on the surface of BSA films with different concentrations of sodium halides and water state in solution // Nanoscale Res. Lett. 2015. Vol. 10(1). Article ID 155. DOI: 10.1186/s11671-015-0860-0 (*Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі літературних даних, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні статті*) (Видання входить до міжнародних наукометричних баз Web of Science і Scopus)
2. **Glibitskiy D. M.**, Gorobchenko O. A., Nikolov O. T., Cheipesh T. A., Roshal A. D., Zibarov A. M., Shestopalova A. V., Semenov M. A., Glibitskiy G. M. Effect of gamma-irradiation of bovine serum albumin solution on the formation of zigzag film textures // Rad. Phys. Chem. 2018. Vol. 144. P. 231–237. DOI: 10.1016/j.radphyschem.2017.08.019 (*Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі літературних даних, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні статті*) (Видання входить до міжнародних наукометричних баз Web of Science і Scopus)

Публікації у наукових фахових виданнях України:

3. Глибицкий Г. М., Семенов М. А., **Глибицкий Д. М.** Текстуры пленок Na-DNA, полученные из растворов, содержащих ТРИС и ЭДТА // Біофіз. вісн. 2011. Вип. 27(2). С. 26–30. (*Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі літературних даних,*

підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні статті)

4. Glibitskiy G. M., Jelali V. V., Semenov M. O., Roshal A. D., **Glibitskiy D. M.**, Volyanskiy O. Yu., Zegrya G. G. Interaction of DNA with Silver Nanoparticles // Ukr. J. Phys. 2012. Vol. 57(7). P. 695–699. *(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі літературних даних, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні статті)* (Видання входить до міжнародних наукометричних баз Web of Science і Scopus)
5. **Glibitskiy D. M.**, Glibitskiy G. M., Semenov M. A., Shestopalova A. V. Textures of BSA films with iron and copper ions // Biophys. Bull. 2016. Vol. 35(1). P. 21–27. *(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі літературних даних, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні статті)*
6. **Glibitskiy D. M.**, Gorobchenko O. A., Nikolov O. T., Shestopalova A. V., Semenov M. A. Characterization of zigzag patterns on the surface of bovine serum albumin films // Biophys. Bull. 2017. Vol. 37(1). P. 16–29. DOI: 10.26565/2075-3810-2017-37-03 *(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі літературних даних, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні статті)*
7. **Glibitskiy D. M.** Modeling of protein and salt redistribution during drying of a solution from a square cell // Biophys. Bull. 2018. Vol. 39(1). P. 55–74. DOI: 10.26565/2075-3810-2018-39-05

Публікації апробаційного характеру (тези доповідей на наукових конференціях) за темою дисертації:

8. **Glibitskiy D. M.**, Glibitskiy G. M., Gorobchenko O. O., Nikolov O. T., Semenov M. A. Textures of BSA films with sodium halides // Nanotechnology and nanomaterials : abstr. Intern. research and practice conf., 23–30 Aug. 2014. Yaremche-Lviv, 2014. P. 538. *(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі літературних даних, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні тези)*
9. Glibitskiy G. M., **Glibitskiy D. M.**, Gorobchenko O. A., Nikolov O. T., Roshal A. D., Semenov M. A. Properties of films of bovine serum albumin with sodium halides // Nanobiophysics 2015: Fundamental and Applied Aspects : abstr. IV Intern. Conf., 1–4 Oct. 2015. Kyiv, 2015. P. 44. *(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі літературних даних, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні тези)*
10. Gorobchenko O. A., Nikolov O. T., **Glibitskiy D. M.**, Roshal A. D., Shestopalova A. V., Semenov M. A., Glibitskiy G. M. Effect of gamma irradiation of protein solution on the formation of film textures // Nanotechnology and nanomaterials : abstr. Intern. research and practice conf., 26–29 Aug. 2015. Lviv, 2015. P. 386. *(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі літературних даних, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні тези)*
11. **Glibitskiy D. M.**, Gorobchenko O. A., Nikolov O. T., Zibarov A. M., Roshal A. D., Semenov M. A., Glibitskiy G. M. Effect of flavin mononucleotide on the texture of BSA films // Nanotechnology and nanomaterials : abstr. Intern. research and practice conf., 24–27 Aug. 2016. Lviv, 2016. P. 132. *(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні*

задач дослідження, аналізі літературних даних, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні тези)

12. **Glibitskiy D. M.**, Zibarov A. M. Effect of Fe(III) on BSA and its film textures // Applied Physics and Engineering : abstr. 2nd Intern. Young Scientists Forum, 10–16 Oct. 2016. Kharkiv, 2016. 1 electronic optical disc (CD-ROM). (*Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі літературних даних, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні тези*)
13. **Glibitskiy D. M.**, Gorobchenko O. A., Zibarov A. M., Cheipesh T. A., Nikolov O. T., Roshal A. D., Semenov M. A., Glibitskiy G. M. Zigzag patterns on the surface of BSA+AlCl₃ films // Nanotechnology and Nanomaterials (NANO-2017) : abstr. Intern. research and practice conf., 23–26 Aug. 2017. Chernivtsi, 2017. P. 601. (*Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі літературних даних, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні тези*)
14. **Glibitskiy D. M.**, Cheipesh T. A., Gorobchenko O. A., Zibarov A. M., Nikolov O. T., Roshal A. D., Semenov M. A., Glibitskiy G. M. Comparison of spectral, light scattering and zigzag pattern analysis methods // Nanotechnology and Nanomaterials (NANO-2017) : abstr. Intern. research and practice conf., 23–26 Aug. 2017. Chernivtsi, 2017. P. 602. (*Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі літературних даних, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні тези*)
15. **Glibitskiy D. M.**, Gorobchenko O. A., Zibarov A. M., Cheipesh T. A., Nikolov O. T., Roshal A. D., Semenov M. A., Glibitskiy G. M. Dynamic light scattering, spectral and zigzag pattern analysis of solutions and films of BSA with FeCl₃ // NANOBIOPHYSICS: Fundamental and Applied Aspects (NBP-2017) : abstr. 5th Intern. Conf., 2–5 Oct. 2017. Kharkiv, 2017. P. 60.

(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі літературних даних, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні тези)

16. **Glibitskiy D.** Modeling of particle redistribution in protein-salt solution evaporating from a square cell // Abstr. 1st Intern. Symp. on Mechanics, 9–12 July 2018. Aberdeen (UK), 2018. URL: https://conferences-nscj.co.uk/abstract/files/10/abstract/me01_A0878.pdf (retrieved 2018-03-25).
17. **Glibitskiy D.**, Gorobchenko O., Nikolov O., Cheipesh T., Roshal A., Zibarov A., Semenov M., Glibitskiy G. Statistical differences of zigzag patterns on films obtained from gamma irradiated BSA solutions // Abstr. 1st Intern. Symp. on Mechanics, 9–12 July 2018. Aberdeen (UK), 2018. URL: https://conferences-nscj.co.uk/abstract/files/10/abstract/me01_A0877.pdf (retrieved 2018-03-25). *(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі літературних даних, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні тези)*

Публікації, які додатково відображають наукові результати дисертації:

18. Спосіб визначення впливу речовини на біополімери : пат. на винахід №110130 Україна / Глибицький Г. М., **Глибицький Д. М.** ; Ін-т радіофізики та електроніки імені О. Я. Усикова НАН України. № а2013 12 123 ; заявлено 16.10.2013 ; опубл. 25.11 2015, Бюл. № 22. *(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі літературних даних, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні патенту)*

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	20
ВСТУП.....	21
РОЗДІЛ 1 МОДЕЛІ ФОРМУВАННЯ ТЕКСТУР ПЛІВОК, МЕТОДИ АНАЛІЗУ ТЕКСТУР ТА ВПЛИВ ХІМІЧНИХ І ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА БІОПОЛІМЕРИ	26
1.1 Теорія і моделі формування плівок.....	26
1.2 Експерименти з формуванням плівок.....	28
1.3 Аналіз текстур плівок	36
1.4 Вплив окремих хімічних та фізичних факторів на ДНК і білки.....	38
1.4.1 Вплив неорганічних катіонів і аніонів на ДНК і білки.....	38
1.4.2 Взаємодія органічних сполук з ДНК і білками	41
1.4.3 Вплив температури і радіації на білки.....	43
Висновки до розділу 1	45
РОЗДІЛ 2 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ МЕТОДИ ВИЗНАЧЕННЯ СТАНУ БІОПОЛІМЕРІВ (ДНК, БСА) ТА МЕТОДИ КІЛЬКІСНОЇ ХАРАКТЕРИЗАЦІЇ ЇХНИХ ТЕКСТУР.....	47
2.1 Приготування вихідних розчинів.....	47
2.2 Методика приготування плівок і конструкція сушильної установки.....	48
2.3 Методи контролю структурного стану біополімеру	48
2.3.1 Інфрачервона абсорбційна спектроскопія	48
2.3.2 Ультрафіолетова абсорбційна спектроскопія	49
2.3.3 Флуориметрія.....	50
2.3.4 Динамічне та електрофоретичне розсіювання світла	50
2.3.5 НВЧ діелектрометрія	51
2.3.6 Вимірювання рН	51
2.4 Фотографування плівок	51
2.5 Аналіз текстур плівок	52
2.5.1 Загальні положення методу аналізу текстур	52
2.5.2 Розрахунок площі текстур.....	56

2.5.3 Розрахунок фрактальної розмірності текстур	56
2.5.4 Обчислення характеристик зигзагоподібних патернів	59
2.5.5 Статистичний аналіз характеристик зигзагоподібних патернів.....	62
2.6. Моделювання процесу висушування плівки	65
2.6.1. Моделювання випаровування рідини у квадратній кюветі.....	66
2.6.1.1. Аналіз динаміки випаровування	70
2.6.2. Моделювання перерозподілу частинок БСА, Na^+ і Cl^-	72
2.6.2.1. Інтерполяція полів U , h і q для часу t	74
2.6.2.2. Розрахунок тривалості кроку моделювання Δt	75
2.6.2.3. Розрахунок заповненості елементів решітки і коефіцієнтів дифузії частинок.....	75
2.6.2.4. Розрахунок ймовірностей руху частинок.....	78
2.6.2.5. Додаткові правила розрахунку ймовірностей та перерозподілу концентрацій.....	82
2.6.3. Аналіз результатів моделювання	84
Висновки до розділу 2	87
РОЗДІЛ 3 ВПЛИВ КОМПОНЕНТІВ БУФЕРНИХ РОЗЧИНІВ (КАТІОНИ, АНІОНИ, ОРГАНІЧНІ СПОЛУКИ) НА ТЕКСТУРИ ПЛІВОК	89
3.1 Вплив Трис і ЕДТО на текстури плівок ДНК.....	89
3.2 Заміна Na^+ на інші лужні метали (K^+ , Rb^+).....	91
3.3 Заміна Cl^- на інші галогенід-іони (F^- , Br^-).....	92
3.4 Подвоєння концентрації БСА і NaCl	102
Висновки до розділу 3	103
РОЗДІЛ 4 ВПЛИВ ОРГАНІЧНИХ І НЕОРГАНІЧНИХ ДОМІШОК НА СТРУКТУРНИЙ СТАН БІОПОЛІМЕРІВ ТА ТЕКСТУРИ ЇХНІХ ПЛІВОК...	104
4.1 Вплив іонів срібла і наночасток срібла на ДНК та текстури.....	104
4.2 Вплив Cu^{2+} і Zn^{2+} на текстури плівок ДНК.....	111
4.3 Вплив Cu^{2+} і Fe^{3+} на характеристики текстур плівок БСА.....	112
4.4 Аналіз впливу Fe^{3+} та продуктів гідролізу FeCl_3 на БСА та характеристики зигзагоподібних патернів	117

4.5 Вплив Al^{3+} на БСА та характеристики зигзагоподібних патернів	119
4.6 Вплив флавінмононуклеотиду на текстури плівок БСА.....	121
Висновки до розділу 4	123
РОЗДІЛ 5 ВПЛИВ ТЕМПЕРАТУРИ і γ -РАДІАЦІЇ НА СТРУКТУРНИЙ СТАН БІОПОЛІМЕРІВ ТА ТЕКСТУРИ ЇХНІХ ПЛІВОК	124
5.1 Вплив термічної денатурації БСА на текстури плівок	124
5.2 Вплив гамма-опромінення БСА на текстури плівок	127
5.3 Аналіз відмінностей між статистичними розподілами $L_{specific}$ для різних доз опромінення розчину БСА.....	132
5.4 Чутливість чисельних характеристик текстур до стану біополімеру.	142
Висновки до розділу 5	144
ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ.....	145
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	147
ДОДАТОК 1 Список публікацій здобувача за темою дисертації.....	170
ДОДАТОК 2 Позначення коробкових графіків.....	175

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

D	фрактальна розмірність
f_d	частота діелектричної релаксації
L_{count}	кількість сегментів зигзагоподібних патернів
L_{mean}	середня довжина сегментів зигзагоподібних патернів
L_{specific}	питома довжина зигзагоподібних патернів
L_{sum}	сумарна довжина сегментів зигзагоподібних патернів
S	відносна площа текстур
Z-патерн	зигзагоподібний патерн
ϵ_s	статична діелектрична проникність
θ_{mean}	середній кут між сегментами зигзагоподібних патернів
λ	довжина хвилі
ν	хвильове число
БАР	біологічно активна речовина
БСА	бичачий сироватковий альбумін
ВВ	відносна вологість
ДЛФО	теорія стійкості ліюфобних колоїдів Дерягіна, Ландау, Фервея, Овербека
ДНК	дезоксирибонуклеїнова кислота
ДРС	метод динамічного розсіювання світла
ЕДТО	$(\text{HOOCCH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$, етилендіамінтетраоцтова кислота
ІЧ-спектроскопія	інфрачервона спектроскопія
НС	наносрібло
РНК	рибонуклеїнова кислота
САЛ	сироватковий альбумін людини
T	температура
Трис	$(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$, трис(гідроксиметил)амінометан
УФ-спектроскопія	ультрафіолетова спектроскопія
ФАД	флавінаденіндинуклеотид
ФМН	флавінмононуклеотид

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. У біофізиці, медицині та екології існує задача визначення впливу зовнішніх умов та їх змін на структуру і функції біологічних систем. Одним з важливих напрямків досліджень у молекулярній біофізиці є вивчення поведінки модельних систем, які містять біополімери у сольових розчинах, оскільки у розчинах з концентраціями солей, близькими до фізіологічних, біополімери мають нативну структуру, яка може дестабілізуватися або руйнуватися при додаванні сторонніх хімічних агентів або при фізичних впливах.

У даний час одним з активно досліджуваних різновидів таких модельних систем є розчини ДНК і білків, що висихають на плоскій підкладці, і формують в результаті плівку на її поверхні. Такі плівки знайшли застосування як інструмент дослідження біополімерів, оскільки стан біополімеру у водному оточенні впливає на характер процесів на різних стадіях випаровування – від яких, у свою чергу, залежить характер видимих візерунків (текстур, патернів) на отриманій плівці.

Теоретичні та експериментальні роботи, присвячені вивченню плівок висушених розчинів біополімерів чи біологічних рідин, зазвичай акцентують увагу на моделюванні фізичних процесів при випаровуванні краплі або на встановленні кореляцій між станом біомолекул у вихідному розчині та характеристиками текстур, що утворюються на поверхні плівок при висушуванні.

Однак питанню комплексного дослідження зв'язку між дією чинників різної природи на біополімери в розчині та текстурами отриманих плівок, а також розробці методів кількісної характеристики текстур, чутливих до певного типу патернів, досі приділялося мало уваги.

У даній роботі проаналізовано, які зміни стану ДНК або білка при зміні складу розчину, додаванні органічних або неорганічних домішок та дії

фізичних факторів відповідають змінам чисельних характеристик текстур та зигзагоподібних патернів на плівках.

Отримані результати, за умови подальшого розвитку методу аналізу патернів, можуть в перспективі знайти застосування у фармакологічній та біотехнологічній галузях для розв'язання зворотної задачі – за змінами параметрів текстур оцінювати стан біополімеру і вплив на нього молекулярного оточення.

Мета і завдання дослідження. Метою дисертації було виявлення зв'язку між впливом хімічних і фізичних факторів на текстури плівок, отриманих з водно-сольових розчинів біополімерів, та з'ясування механізмів впливу стану біополімеру на текстури.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити *такі завдання:*

1. Встановити, як структурний стан та агрегація біополімеру впливає на формування патернів.
2. Визначити критичність ролі катіонів Na^+ і аніонів Cl^- у формуванні текстур на плівках.
3. Встановити, як впливає на утворення текстур дестабілізація та пошкодження біополімеру під дією іонів солей металів.
4. З'ясувати, як впливає на утворення текстур наявність у розчині органічних домішок різних концентрацій.
5. Визначити вплив на характеристики текстур термічної денатурації біополімеру.
6. Визначити вплив на характеристики текстур змін стану біополімеру під дією різних доз гамма-опромінення.

Об'єкт дослідження. Особливості текстур плівок, отриманих при висушуванні водно-сольових розчинів біополімерів.

Предмет дослідження. Взаємозв'язок структурного та агрегаційного стану біополімерів з формованими текстурами їхніх сухих плівок.

Методи дослідження. Інфрачервона і ультрафіолетова спектроскопії та флуориметрія для відстеження змін структурного стану біополімерів. Діелектрометрія в надвисокочастотному діапазоні довжин хвиль для визначення стану водного оточення біополімерів. Динамічне і електрофоретичне розсіювання світла для визначення розміру, дисперсності та електрокінетичного потенціалу біополімерів. рН-метрія для оцінки кислотності розчину. Оптична мікроскопія та цифрова обробка зображень, які дозволили кількісно охарактеризувати зміни у текстурах плівок.

Наукова новизна отриманих результатів.

1. Вперше надано докази впливу структурного стану біополімеру на площу і фрактальну розмірність текстур і на характеристики зигзагоподібних патернів на поверхні плівок, отриманих з розчину біополімеру.
2. Запропоновано новий метод аналізу впливу біологічно активних речовин на біополімери з використанням визначення площі і фрактальної розмірності текстур плівок, а також характеристик зигзагоподібних патернів.
3. Показано, що зигзагоподібні структури на плівках біополімерів формуються у присутності іонів Cl^- , але не іонів F^- або Br^- .
4. Виявлено, що найбільш інформативними (чутливими до впливів) характеристиками зигзагоподібних патернів є кількість і довжина сегментів зигзагів.

Особистий внесок здобувача. Автором дисертаційної роботи самостійно проведено аналіз наукової літератури, створено програмно-апаратний комплекс для отримання плівок біополімерів, отримано результати експериментальних досліджень і проведено їхню обробку. Автором особисто виконано первинний аналіз результатів і сформульовано попередні висновки. Разом з науковим керівником, д.ф.-м.н., проф. Шестопаловою Г.В., було визначено мету, задачі роботи і способи їх вирішення, здійснено інтерпретацію отриманих результатів і зроблено остаточні висновки. В опублікованих спільно зі співавторами працях особистий внесок здобувача

полягає: в роботах [1-18] – участь у постановці задачі дослідження, аналіз літературних даних, підготовка зразків, зйомка та обробка фотографій плівок, вимірювання електричної провідності розчинів, отримання спектрів УФ-поглинання та флуоресценції, аналіз та інтерпретація отриманих експериментальних даних, написання статей, патенту і тез.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи доповідалися та обговорювалися на таких міжнародних та вітчизняних конференціях: II Міжнародна науково-практична конференція "Нанотехнології та наноматеріали". – Яремче-Львів (Україна), 2014; III і IV Міжнародна науково-практична конференція "Нанотехнології та наноматеріали". – Львів (Україна), 2015, 2016; V Міжнародна науково-практична конференція "Нанотехнології та наноматеріали". – Чернівці (Україна), 2017; IV International Conference "Nanobiophysics: Fundamental and Applied Aspects". – Kyiv (Ukraine), 2015; V International Conference "Nanobiophysics: Fundamental and Applied Aspects". – Kharkiv (Ukraine), 2017; International Young Scientists Forum on Applied Physics and Engineering. – Kharkiv (Ukraine), 2016; 1st International Symposium on Mechanics. – Aberdeen (UK), 2018.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дослідження за темою дисертації проводились згідно з планом науково-дослідних робіт відділу біофізики Інституту радіофізики та електроніки ім. О. Я. Усикова НАН України в рамках фундаментальних держбюджетних НДР: «Молекулярні моделі комплексів біологічно активних речовин з нуклеїновими кислотами за умовами мультимодального та конкурентного зв'язування» (шифр «Модель», номер держреєстрації 0107U001079); «Механізми впливу біологічно-активних речовин і електромагнітних полів гіга- та терагерцевого діапазонів на біоб'єкти різного рівню організації (біополімери, біомембрани, клітини)» (шифр «Модель-2», номер держреєстрації 0111U010475).

Практичне значення отриманих результатів. Результати роботи та їх ґрунтовний аналіз дають внесок у розуміння ролі біополімерів, води та іонів солі при формуванні текстур плівок, а також зв'язку структурних змін і агрегації біополімерів з утворенням регулярних патернів. Розроблений програмно-апаратний комплекс для отримання плівок з розчинів біополімерів та запропонована методика кількісної характеристики текстур за властивостями зигзагоподібних патернів у подальшому можуть бути використані для оцінки рівня нативності структури біополімерів при дії хімічних та фізичних денатуруючих чинників на рівні лабораторних досліджень. Отриманий за результатами роботи патент України №110130 «Спосіб визначення впливу речовини на біополімери» створює підґрунтя для застосування запропонованої методики в галузях експрес-фармакології та біотехнології для відбору лікарських і біологічно активних речовин за ступенем їх впливу на стан біополімерів.

В цілому результати досліджень можуть застосовуватися для експрес-аналізу в галузях фармакології та біотехнології для відбору лікарських і біологічно активних речовин за ступенем впливу на біополімери.

Публікації. Основні результати дисертації опубліковано в 18 наукових працях; з них: 7 статей у міжнародних та вітчизняних фахових наукових журналах, 1 патент України та 10 тез доповідей на міжнародних і вітчизняних конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, 5 розділів, загальних висновків, списку використаних джерел та 2 додатків. Обсяг загального тексту дисертації складає 8,0 а.а. (175 стор.), з них основного тексту 5,5 а.а. (120 стор.). Робота ілюстрована 16 таблицями та 70 рисунками. Список використаних джерел містить 223 найменування.

РОЗДІЛ 1

МОДЕЛІ ФОРМУВАННЯ ТЕКСТУР ПЛІВОК, МЕТОДИ АНАЛІЗУ ТЕКСТУР ТА ВПЛИВ ХІМІЧНИХ І ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА БІОПОЛІМЕРИ

Останнім часом з'явилася значна кількість робіт, присвячених експериментальному дослідженню і теоретичному моделюванню процесів структуризації речовини при випаровуванні крапель колоїдних розчинів, зокрема розчинів біополімерів та біологічних рідин [19-69]. Плівки, що формуються внаслідок висихання цих розчинів, знайшли практичне застосування в ряді галузей – від досліджень молекулярної біології [19, 20], скринінгу препаратів [21] та діагностики захворювань [22-25] до аналізу якості продукції [26-30] та виробництва мікроелектроніки [31, 32].

Проте кількісний взаємозв'язок впливу на стан біологічних макромолекул з формуванням тих чи інших текстур на поверхні висушеної плівки залишається мало дослідженим.

1.1 Теорія і моделі формування плівок

В останні десятиріччя з'явився досить великий обсяг теоретичних робіт, які аналізують різні аспекти висихання крапель колоїдно-сольових розчинів і утворення патернів на результируючих плівках.

Проведений у роботі [33] аналіз літератури показав, що явища, які спостерігаються при дегідратації біологічних рідин, характерні для колоїдних розчинів взагалі. У цій роботі була запропонована модель перерозподілу компонент в краплі рідини, що випаровується, і сформульована узагальнена картина процесів, що протікають при дегідратаційній самоорганізації біологічних рідин.

У роботі [34] досліджувався вплив характеру випаровування на перерозподіл речовин багатокomпонентної рідини всередині краплі, що висихає. Там було показано, що дифузія протидіє виносу речовин з великим

коефіцієнтом дифузії (для біологічних рідин такою речовиною є NaCl) на край краплі, яка випаровується. Характер перерозподілу речовин якісно не залежить від конкретного закону, що описує щільність потоку пари.

У роботі [35] показано, що при висиханні краплі біологічної рідини на підкладці дифузійні процеси в істотному ступені пригнічують винос капілярними течіями солі на край краплі, але не роблять істотного впливу на рух колоїдних частинок.

У роботі [36] показано, що конкуренція між адвекцією і дифузією призводить до накопичення великих часток (білка) на краю краплі, тоді як розчинені речовини (солі) розподіляються більш рівномірно по діаметру краплі. Запропонована авторами [36] модель дозволяє передбачити еволюцію форми краплі під час висихання та її остаточну форму.

У роботі [37] було проведено дослідження стабільності росту кристала і аналіз різних факторів, які можуть призводити до утворення дендритів. Проведене авторами цієї роботи комп'ютерне моделювання росту кристалу з перенасиченого розчину показало, що він є нестійким по відношенню до малих збурень різного характеру (відхилення форми кристала від рівноважної, флуктуації концентрації розчину, флуктуації кінетичного коефіцієнта кристалізації); всі ці збурення призводять до формування дендритів.

У роботі [38] висихання на плоскій підкладці і самоорганізація краплі біорідини (БР) при клиноподібній дегідратації розглядаються з точки зору теорій перколяції і гелеутворення. Автори виділяють наступні етапи при структуруванні краплі: нерівномірне випаровування БР по периметру краплі внаслідок піннінга; рух колоїдних частинок від центру до країв краплі; формування гелю на периферії краплі і розтріскування білкової плівки у напрямку до центру; формування в центральній частині фації структур, що залежать від властивостей БР і використовуються як діагностичні ознаки.

У роботі [39], на підставі відеозапису процесу висихання, автори дійшли висновку, що в гелевій плівці формуються порожнечі по мірі випаровування і що ізольовані краплі рідини притягуються до кінця зростаючого дендрита.

Вони запропонували алгоритм моделювання переходу від режиму зростання великих гранованих кристалів до режиму високо розгалужених мультифрактальних патернів. Ця модель дозволяє відтворити процеси, що спостерігаються, при яких повільне випаровування має тенденцію формувати грановані кристали, а не дендрити, а збільшення концентрації солі робить зростання більш регулярним.

У роботі [40] вивчалось формування відкладень колоїдних частинок з нанолітрових крапель при різних рН, щоб з'ясувати, як взаємодії Дерягіна-Ландау-Фервея-Овербека (ДЛФО) і сили ван дер Ваальса змінюють процес агрегації частинок. Автори [40] пропонують фазову діаграму, щоб пояснити, як на форму колоїдного агрегату впливає конкуренція трьох видів течій: радіальний потік, обумовлений випаровуванням на лінії змочування, потік рециркуляції Марангоні, обумовлений градієнтами поверхневого натягу, і перенесення частинок до субстрату, обумовлене ДЛФО-взаємодіями. Ця фазова діаграма пояснює три типи відкладень, що експериментально спостережуються (кільце на периферії, невеликий центральний бугор і рівномірний шар).

В усіх розглянутих літературних джерелах аналізується висихання вільних крапель на підложці. Однак для забезпечення відтворюваності контурів та площ отриманих плівок, на практиці може бути необхідно використовувати кювету зі стінками на краях, яка повністю заповнюється розчином. Це змінює умови випаровування та хід процесу висихання; отримані у такий спосіб плівки є мало дослідженим об'єктом.

1.2 Експерименти з формуванням плівок

Утворення нетривіальних патернів при висиханні крапель колоїдно-сольових розчинів спостерігається в багатьох експериментальних роботах.

У роботі [41] були проведені експерименти з модельними рідинами, що імітують сироватку крові людини. Було виявлено, що розчин хлориду натрію і альбуміну забезпечує відтворення структур, які спостерігаються при

клиноподібній дегідратації крапель сироватки крові. Автори показали, що зі зміною концентрації білка кристалічні структури приймають різні форми, переважно дендритні.

У роботі [42] фазові переходи білка в сидячих висихаючих краплях колоїдних систем білок-сіль-вода були вивчені за допомогою оптичної та атомно-силової мікроскопії. Наступна послідовність подій спостерігалася під час висихання крапель: прикріплення краплі до скляної підложки; перерозподіл колоїдної фази внаслідок гідродинамічного відцентрового потоку; утворення білкового кільця навколо краю; утворення білкових просторових структур всередині білкового кільця, які проходять в гель в середині краплі; кристалізація солей в гелі, що всихає. Перед гелеутворенням колоїдні частинки утворюють фрактальні кластери. У висушених краплях безсолевих білкових розчинів не спостерігалось видимих ознак текстур на поверхні плівки.

У роботі [43] показано, що при малому вмісті білка в розчині NaCl (менш ніж 1% масової частки) основним структурним елементом сольового візерунка є фігура з одним-двома великими монокристалами в центрі, оточеними дугами, що складаються з дрібних полікристалів. При вмісті білка, близького до фізіологічного (7-9% масової частки), сіль кристалізується переважно у вигляді різноманітних дендритних структур, що може бути пов'язано з більшою в'язкістю і неоднорідністю середовища.

У роботі [44] показано, що фазовий перехід солей відбувається в надрах попередньо сформованої гелеподібної органічної матриці, фізичні властивості якої впливають на морфологічні особливості сольових патернів, що формуються, і кінетику процесу кристалізації солі. Показано, що пошкодження білка УФ-опроміненням порушує формування регулярного гелю і вносить хаотичність в утворення патернів.

У роботі [45] показано, що структурна еволюція крапель, що висихають, являє собою складний багатоетапний процес, в якому умовно можна виділити

дві стадії – події, що відбуваються під час випаровування вільної води, і структуроутворення, пов'язане з випаровуванням пухко зв'язаної води.

У роботі [46] вивчалася дія солей металів (Na, K, Li, Mg, Ca, Ni, Co, Cr, Fe) на кристалізацію водних розчинів БСА за допомогою атомної силової мікроскопії. Макроскопічного поділу фаз між білком і сіллю авторами не було виявлено. Отримані структури залежали від типу катіона: неструктуровані білково-сольові агрегати (LiCl , FeCl_3 , CrCl_3 , NiCl_2), білково-сольові мезокомпозиції великого розміру (CoCl_2 , NaCl , KCl), змішані білково-сольові гелі (CaCl_2) і системи з мікроскопічним поділом фаз (MgCl_2). Для систем NaCl -БСА та KCl -БСА спостерігалися псевдо-фрактальні структури, причому кут між структурами (90° для NaCl і 120° для KCl) приводив до прямокутної або майже гексагональної симетрії відповідно. Автори припускають, що подібні патерни не мають однозначної залежності від заряду солі і виникають в результаті процесу молекулярного розпізнавання між БСА і сіллю.

У роботі [47] було визначено, що контроль дендритного росту кристалів в плівці NaCl -БСА включає в себе формування трикутних кристалітів і кепінг (фацетування) на кінцях граней. Автори роботи вважають, що трикутні кристаліти складаються з NaCl , що припускає локальний мезоскопічний поділ фаз і те, що орієнтація кристалічного росту визначається органічним субстратом.

У роботі [48] автори використали скануючу електронну мікроскопію і відеозаписи оптичної мікроскопії для вивчення морфологічної еволюції формування патернів під час випаровування крапель водних розчинів лізоциму з різними концентраціями NaCl . У залежності від концентрації NaCl , в відкладеннях, що утворюються, спостерігалися аморфне периферичне кільце і внутрішня ділянка, що містить кристалітні і дендритні мультифрактальні ієрархічні структури. У разі крапель, що містять тільки NaCl , під час випаровування формувалися тільки великі кристали солі в центрі краплі.

У роботі [49] краплі розчинів NaCl з полинуклеотидами формували виразні дендритні і фракталоподібні (типу "щільно розгалужена морфологія") патерни кристалічного зростання. Отримані авторами результати підтверджують гіпотезу, що при 0% відносної вологості певні послідовності нуклеотидів не денатурують завдяки тому, що метильна група тиміну утримує молекулу води між собою і цукрово-фосфатним хребтом. Автори роботи вважають, що різні текстури створюються різними послідовностями полинуклеотидів, а не кристалами солі, оскільки сіль була однаковою в усіх плівках.

У роботі [50] автори отримали результати, аналогічні [49] для високих концентрацій солі (3 молекули NaCl на пару основ ДНК), а також гладкі плівки без патернів для низьких концентрацій (0,2 молекул NaCl на пару основ ДНК). Дендритні патерни з'являлися в тих місцях, де вода випаровувалася в останню чергу, що автори пов'язують з високою розчинністю NaCl (сіль залишається в розчині до пізніх етапів висихання). Скануюча електронна і тунельна мікроскопії, а також електронна дисперсійна спектроскопія показали, що деяка кількість NaCl була розподілена по всій поверхні плівок, і що дендрити складалися з кристалітів NaCl розміром 1-5 мкм.

У роботі [51] оптична і атомна силова мікроскопії дозволили спостерігати дендритні сферулітні структури, блокові структури і псевдо-дендритні структури типу "гребінки диявола" на плівках, отриманих з БСА і різних солей натрію. Автори роботи з'ясували, що аніонне розпізнавання і температура чинять сильний вплив на структурування цих систем під час отримання плівки. Було показано, що натрій і калій викликають утворення ортогональних і гексагональних розгалужених псевдо-дендритних структур відповідно, ріст яких контролювався однограневим кепінгом кристалітів NaCl. Автори вважають, що такий ріст відбувається у гелі, що висихає, уздовж шляхів, які визначаються взаємодією між білково-сольовими доменами.

У роботі [52] відзначається, що кінетика дифузії має тенденцію приводити систему до "декорованих" або нерегулярних форм завдяки нестабільності Маллінс-Секеркі [53] і що динаміка мікроскопічної межі розділу задає характерну довжину і переважні напрямки росту. Було встановлено, що дендритні і ограновані патерни вимагають анізотропії (градієнта однієї з термодинамічних змінних), інакше утворюються тільки щільно-розгалужені морфології; в умовах, коли можливі кілька морфологій, на практиці реалізується тільки та з них, що росте найшвидше.

У роботі [54] в процесі росту дендритних кристалів з перенасичених розчинів NH_4Cl і $\text{NH}_4\text{Cl}(\text{CuSO}_4)$ спостерігалися чітко періодичні морфології з дальнім порядком. Ці структури в основному представлені дендритами, в яких стовбур періодично змінює напрямок зигзагоподібним чином, і шестикутними стільниками, утвореними переплетенням декількох зигзагів, що ростуть паралельно один одному. Умови виникнення таких режимів росту, як мінімум, включають наступні вимоги: (1) товщина розчину повинна бути менше довжини дифузії, і (2) грань в переважному напрямку росту повинна бути холодніше рівноважної температури закруглення. Автори також зазначають, що невеликі кількості домішок CuSO_4 пригнічують нуклеацію, яка відбувається при формуванні бічних гілок.

У роботі [55] утворення звивистих дендритних патернів частинок нанозолота спостерігається на молекулярно гладких і хімічно однорідних поверхнях. На думку авторів роботи, поява таких морфологій на однорідних і ізотропних поверхнях можлива тільки завдяки гідродинамічним ефектам, які мають місце на пізній стадії висихання і зменшення краплі. Було показано, що механізми зростання визначаються переважно змочуючими властивостями "субстрату-дисперсії". Шляхом регулювання хімічних властивостей поверхні і складу субстрату автори змогли отримати різні форми і розміри патернів.

У роботі [56] було виявлено, що виникнення і топологічні особливості великомасштабних і добре організованих розгалужених поверхневих

агрегатів контролюються двома параметрами: (1) фактичною об'ємною часткою краплі в кінці стадії висихання і (2) властивостями поверхні підкладки. При досягненні порогової об'ємної частки утворюються з'єднані між собою агрегати, які забезпечують початкові центри зростання складних візерунків на поверхні. Топографія і змочуючі властивості поверхні, за допомогою гідродинамічних ефектів (гідродинамічного зсуву) на пізній стадії висихання, контролюють структурний порядок і симетрію складних паттернів агрегації.

У роботі [57] було показано, що формування і топологічні особливості складних структур, які виникають в результаті висихання, можуть керуватися розміром частинок, температурою сушки і енергією поверхні підкладки. Автори роботи виявили, що: (1) високі швидкості випаровування сприяють кристалізації найменших наночастинок в порівнянні з більш великими; (2) термомеханічна стабільність агрегатів зменшується зі збільшенням розміру наночастинок; (3) змочуючі властивості підкладки (які визначають силу взаємодій частинок і поверхні) можуть повністю нейтралізувати вплив розміру наночастинок і температури на виникнення (але не на морфологію) складних агрегатів.

У роботі [58] було показано, що краплі двокомпонентного розчину (альбінат полісахариду і наночастинок золота) призводять, в результаті висихання, до утворення фібрилярних дендритних патернів значних розмірів і щільності розгалуження. На думку авторів роботи, формування цих структур обумовлено низкою ключових параметрів (складом розчину і залишковим вмістом солі, режимом сушіння, розміром наночастинок) і механізмів (зрушення-дренаж і концентрація; конденсація противоіонів; созбірка та сокристалізація полімеру, наночастинок і залишкових солей).

У роботі [59] автори досліджували патерни, які утворюються з розчинів NaCl і полімеру (картопляний крохмаль і карбокси-метилцелюлоза) на різних підкладках (скло, поліпропілен, мідь і алюміній). Було встановлено, що додавання солі значно збільшує швидкість випаровування, але подальше

додавання солі зменшує його знову; збільшення або зменшення швидкості випаровування залежить від того, як сіль взаємодіє з іншими компонентами розчину. Температура клейстеризації картопляного крохмалю спочатку збільшується, а потім зменшується з ростом концентрації солі, тоді як зміна поверхневого натягу проявляє протилежну поведінку.

У роботі [60] автори вивчали формування патернів з сольових розчинів БСА. Дендритні текстури спостерігалися у випадку великої швидкості випаровування, яка була досягнута за допомогою вакууму. Автори роботи дійшли висновку, що існують чотири основних сили, що діють на кожен молекулу білка в процесі випаровування: капілярна сила, пов'язана із закріпленням лінії контакту в краплі, що висихає; сила адгезії між білком і скляною підкладкою; електростатична сила, обумовлена зарядами білків; сила тертя, яка діє проти руху білка.

У роботі [61] відзначається, що кристаліти NH_4Cl , вирощені в агарозному гелі, демонструють значні кореляції своєї кристалографічної орієнтації, утворюючи звивисті патерни за допомогою послідовних гетерогенних нуклеацій двох типів кристалітів (трикутного пірамідального і подовженого). Цей процес агрегації відбувається при наступних умовах: (1) низька рушійна сила росту, (2) сильна кристалографічна анізотропія, (3) рівень пересичення нижче, ніж необхідно для кінетичного загруднення.

У роботі [62] автори також повідомляють про зигзагоподібні гілки кристалітів при кристалізації FeSO_4 з водного розчину і пропонують агрегацію, обмежену нуклеацією, як модель для такого типу росту кристалів. Було показано, що зигзагоподібні структури приблизно на два порядки величини більші, ніж розмір пористих каналів в гелевому середовищі, і розмір кристаліта в звивистих гілках не залежить від концентрації агарози. Розмір кристаліта в даному випадку значно менше, ніж проміжок між верхньою і нижньою стінками скляної комірки; так що, на відміну від [54], межі комірки не грають суттєвої ролі в формуванні даних зигзагоподібних патернів.

У роботі [27] вивчалось застосування структуроутворення, індукованого випаровуванням, як можливого інструменту для аналізу якості пшениці. Залежно від речовин, які пройшли в воду під час замочування зерен, спостерігалися такі патерни, як: плями, структури з одиничними розгалуженнями, дендрити, високоорганізовані шестикутні форми і фракталоподібні структури. Автори роботи дійшли висновку, що більш життєздатні культурні сорти формували більш складні патерни, тоді як більш слабкі сорти приводили до менш складних форм.

Таким чином, при висиханні сольових розчинів органічних полімерів [27, 35, 48, 63] і розчинів наночастинок [40, 54, 55, 58, 64, 65] на поверхні плівки може виникати велика різноманітність макро- і мікро-патернів: концентричні кільця [38, 39], тріщини [38, 39, 41], бляшки і плями [38]; макроскопічні кристали [59], кубічні кристаліти [59], пористі, сітчасті і зернисті аморфні структури [38], фрактальні агрегати [52, 59], сферичні і волоконоподібні кластери [57, 58], DLA-агрегати [52, 59], щільно-розгалужені і пальцевидні візерунки [52], «сніжинки» [52], дендрити [58-60], витягнуті деревовидні структури [55], зигзаги і гексагональні комірки [54, 55], розетки, раковини і "китайські стріли" [60]. Можна виділити такі фактори, що впливають на утворення тих чи інших патернів: склад краплі (співвідношення концентрацій компонент і домішок) [39, 54, 59], розмір частинок [57], заряд частинок [66], природа розчинника [59], в'язкість [59], рН [66], температура [39, 57, 59], вологість [39, 59], режим висихання [58], природа субстрату (змочувальний або незмочувальний, шорсткість, пористість) [39, 56, 59], геометричні обмеження [54], орієнтація початкового кристалу [54]. Ці фактори, в свою чергу, впливають на об'ємну фракцію краплі на пізній стадії висихання [56], анізотропію (градієнт) і флуктуації фізико-хімічних параметрів [55], поверхневу енергію [55, 57], гідродинамічні ефекти (локальні течії, гідродинамічні зрушення, прилипання лінії контакту) [55, 56, 58], кінетику фазового переходу (температуру кінетичного загрублення) [54], созбірку / сокристалізацію полімеру, наночастинок і солі

[58], рухливість частинок [55, 66], перенесення частинок (дифузія, радіальні течії, сила ДЛФО, течії Марангоні) [36, 40, 67]. Контроль всіх цих факторів дозволив би управляти процесом висихання краплі і, відповідно, утворенням тих чи інших структур [67].

На жаль, в існуючих експериментальних роботах не завжди виконувався контроль умов висушування (рівня вологості та температури), а також не проводився багатогранний аналіз зв'язку між текстурами, що формуються на плівках, та дією чинників різної природи на біополімер у розчині. Аналіз цих явищ з точки зору молекулярної біофізики дозволив би розширити розуміння процесу формування текстур на плівках біополімерів.

1.3 Аналіз текстур плівок

Для кількісної характеристики текстур на поверхні плівок, отриманих з біологічних рідин та розчинів біополімерів, у існуючих роботах зазвичай застосовуються статистичні характеристики розподілу інтенсивності елементів зображення та фрактальна розмірність.

У роботі [68] для кількісної оцінки розподілу структурних елементів на висушеній плівці біорідини було використане оптичне радіально-кутове сканування з підрахунком кількості флуктуацій оптичної щільності на колах різних радіусів і на різних рівнях оптичної щільності.

У роботі [26] зразки зерна були проаналізовані за допомогою методу, в якому дендритні кристалічні структури формуються в процесі кристалізації водних розчинів дигідрату CuCl_2 і досліджуваної біологічної речовини (т.зв. метод "біокристалізації"). В цій роботі цифрові зображення одержуваних плівок були проаналізовані щодо розподілу рівня сірого в колових ділянках різного розміру. Цей критерій показав значну диференціацію для всіх зразків зерна для ділянок, розмір яких становив 60-80% від розміру плівки.

У роботі [27] зразки плівки, що утворювалася із старих і свіжих сортів пшениці, аналізували методом місцевої з'єднаної фрактальної розмірності. Була виявлена кореляція між якістю насіння пшениці та патернами, що

утворюються після випаровування крапель: більш життєздатні культурні сорти створювали більш складні моделі, в той час як більш слабкі сорти створювали переважно бідні форми.

У роботі [19] фрактальна розмірність використовувалася для характеристики структур, що формувалися на плівках, отриманих з водних розчинів БСА і хлорофілу. Була виявлена залежність фрактальної розмірності від концентрації хлорофілу; вона досягала значень, передбачених моделлю агрегації з обмеженою дифузією (DLA) при $5.5 \cdot 10^{-4}$ М.

У роботі [28] була запропонована процедура комп'ютеризованого аналізу зображень біокристалограм на основі параметрів першого і другого порядку, описаних у роботі [69]. Процедура обчислює параметри першого порядку (середнє значення, дисперсія, коваріація, медіана та ін.) з гістограм зображення і параметри другого порядку (енергія, ентропія, максимальна ймовірність, кореляція та ін.) на основі аналізу матриць суміжності рівня сірого у декількох масштабах, і виконує класифікацію окремих зображень за допомогою покрокового дискримінантного аналізу.

У роботі [29] був запропонований стандартизований метод комп'ютеризованої оцінки моделей біокристалізації, заснований на аналізі текстури, розробленому у [28], який використовує три змінні другого порядку (діагональний момент, каппа, сума дисперсії). Статистична оцінка, проведена в рамках моделі лінійно-змішаних ефектів, показала, що повторюваність методу є низькою, а варіабельність є високою, а також, що стадія кристалізації має найбільший вплив. Проте, було показано, що цей метод може диференціювати патерни, отримані для моркви, обробленої різними методами [29] і зразків молока і масла при різних режимах годівлі [70] як статистично значимі.

У роботі [23] комп'ютерна ідентифікація структури крапель, що висихають, і динаміка цього процесу були використані, щоб продемонструвати потенціал методу крапельної мікро-хроматографії для напівкількісного діагностичного аналізу зразків сироватки. Описаний в статті

метод обчислює ряд параметрів зображення в межах прямокутного вікна в залежності від часу, причому ці параметри характеризують різні структурні і спектральні характеристики (середній контраст, середня яскравість, середньо-квадратичне відхилення, кількість і спрямованість ліній, кольорова гістограма зміни інтенсивності світла). Фазова траєкторія цих параметрів потім використовується як характерний "підпис" даного зразка.

З іншого боку, у наведених роботах не розглядаються кількісні характеристики текстур, які б брали до уваги належність тих чи інших структур на плівці до специфічних класів патернів. Систематичне вивчення зв'язку стану біополімеру у розчині з кількісними характеристиками текстур отриманих плівок, відповідно, є актуальною областю досліджень.

1.4 Вплив окремих хімічних та фізичних факторів на ДНК і білки

1.4.1 Вплив неорганічних катіонів і аніонів на ДНК і білки

Вплив неорганічних іонів на біологічні молекули – дуже велика тема, вивченню якої присвячено багато наукових робіт, як за кордоном, так і в Україні. Зокрема, результати дослідження властивостей металевих комплексів нуклеїнових кислот у розчинах представлено у роботах Ю. П. Благого [71, 72], а також у публікаціях колективу його співавторів [73-76]. Нижче розглянуто роботи, присвячені взаємодії ДНК та білків з металевими та галогенід-іонами, що досліджувалися у даній дисертації.

У роботі [77] дослідження іон-специфічного зв'язування з БСА проводили з використанням потенціометричного титрування та електрофоретичного розсіювання світла. Було встановлено, що аніони зв'язуються з поверхнею білка при кислому рН, де білок несе позитивний заряд ($Z_p > 0$), відповідно до серії Гофмейстера ($\text{Cl}^- < \text{Br}^- < \text{NO}_3^- < \text{I}^- < \text{SCN}^-$), а також у ізоіонній точці ($Z_p = 0$).

У роботі [78] моделювання молекулярної динаміки олігомера ДНК з 16 пар основ показало, що іони Na^+ проникають всередину ДНК і конденсуються навколо зовнішньої поверхні ДНК в значно більшому ступені

в порівнянні з іонами K^+ . Більша спорідненість Na^+ до ДНК пояснювалася як поєднання трьох різних механізмів: (1) менші іони Na^+ стерично краще підходять до внутрішньої структури ДНК; (2) менші іони Na^+ наближаються до зовнішньої поверхні ДНК та відчувають більш сильний вплив електростатичного потенціалу ДНК; (3) K^+ утворює кластери з СГ легше через менші дегідратаційні втрати, що, в свою чергу, призводить до кращого електростатичного екранування і меншої конденсації K^+ навколо ДНК.

У роботі [79] було вивчено зв'язуючий механізм взаємодії іонів галогенів (F^- , Br^- і I^-) з БСА і гемоглобіном при різних температурах за допомогою іоноселективних електродів. Результати показали, що: (1) сайти зв'язування для F^- на білкових молекулах більші, ніж для Br^- і I^- ; (2) кількість сайтів зв'язування галогенід-іонів зростає з підвищенням температури; (3) константи зв'язування для взаємодії іонів галогенів з білками поступово зменшуються при зростанні розміру іонів галогенів і при підвищенні температури. Зміна ентальпії при взаємодії показала, що взаємодія іонів галогенів з білками, в основному, має електростатичну природу.

У роботі [80] було показано, що іони лужних металів вибірково впливають на сферу гідратації ДНК і що, за винятком Li^+ , рідкокристалічний перехід ДНК відбувається в їхній присутності при концентрації 0,89 мг/мл ДНК. Було також встановлено, що розмір іона і рівень гідратації впливає на час переходу від холестеричної до стовпчастої гексагональної фази (швидше при високих концентраціях іонів металів і великих розмірах іона).

У роботі [81] було досліджено зв'язування іонів срібла $Ag(I)$ з ДНК і РНК у водних розчинах. Спектроскопічні дослідження показали, що: (1) в Ag -ДНК комплексі типу I, $Ag(I)$ зв'язується з сайтом N7 гуаніну при низькій концентрації катіонів і сайтом N7 аденіну при більш високих концентраціях, але не з групою фосфатного остову; (2) при співвідношенні Ag /нуклеотид 1:2 утворюються комплекси Ag -ДНК II типу, в яких $Ag(I)$ зв'язується з базовими парами G-C і A-T; (3) $Ag(I)$ зв'язується з атомом гуаніну N7, але не з аденіном і групою фосфатного остову в Ag -РНК комплексах; (4) ДНК залишалається в

В-формі, а РНК зберігає свою конформацію, незважаючи на незначну зміну цукро-фосфатної геометрії. Крім того, за допомогою аналізу Скетчарда було продемонстровано, що існують дві ділянки зв'язування для комплексів Ag-ДНК на основі гуаніну та аденіну, тоді як Ag-РНК демонструє тільки один сайт зв'язування на основі гуаніну.

При дослідженні ДНК з тканин тварин, які тривалий час піддавалися опроміненню в зоні Чорнобиля, авторами роботи [72] було показано, що іони Cu^- при зв'язуванні з ДНК самі по собі здатні викликати розриви ДНК, а також посилюють пошкоджуючу дію опромінення на ДНК. З іншого боку, іони Zn^- в деяких випадках мали протилежний ефект, що автори пов'язують з активацією процесів репарації ланцюгів ДНК.

У роботі [82] було показано, що БСА без гему має специфічний Fe^{3+} -зв'язуючий сайт, суміжний з обома залишками триптофану в БСА. Зі спектрів четвертої похідної і кругового дихроїзму був зроблений висновок про те, що іони Fe^{2+} і Fe^{3+} не мають ніяких очевидних впливів на вторинну структуру БСА і що іони Fe^{3+} зв'язуються з залишками триптофану в БСА.

У роботах [83, 84] було виявлено, що, в залежності від концентрації алюмінію, з САЛ зв'язуються до трьох іонів Al^{3+} [83] у двох координаційних сайтах [84].

Дослідження зв'язування іонів міді з БСА вказують на те, що БСА має один сайт з високою константою зв'язування для Cu(II) [85, 86], а також один сайт з порівняно меншою константою зв'язування [86].

У роботі [87] було показано, що Zn^{2+} , Ni^{2+} і Co^{2+} зв'язуються з дуплексною ДНК і викликають повільну конформаційну зміну при значеннях рН вище 8; на противагу цьому, додавання тих же концентрацій Ag^+ викликало швидку денатурацію ДНК.

Було показано, що іони металів у солях впливають на організацію ДНК кількома способами: індукований сіллю перехід з В- у А-форму [88]; зміна конформації з В-форми до С-форми або Z-форми подвійної спіралі [89]; перехід від об'ємної до плоскої спіралі [90]; гвинтова дестабілізація і

плавлення [91]; агрегація ДНК і конденсація в компактні структури [92]. Такі структурні зміни також відбуваються в залежності від концентрації солі [93].

У роботі [94] було відзначено, що: (1) зв'язування Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ba^{2+} , Mn^{2+} або Cd^{2+} між N7 і молекулами кисню фосфатних груп супроводжується зміною конформації ДНК; (2) більшість перехідних металів вступають в хімічну реакцію з атомом N7 пурину або N3 піримідину і змінюють форму подвійної спіралі; (3) зв'язування з перехідним металом у деяких G-C сайтах призводить до генерації радикалів внаслідок окислення перекисом водню, що призводить до пошкодження ДНК; (4) аніони в солях металів також впливають на формування комплексів та їх гідратацію.

У роботі [95] було встановлено, що аніони призводять до випадення в осадок сироваткового альбуміну при рН трохи нижче ізоелектричної точки, тоді як катіони не призводять до випадення в осадок до тих пір, поки рН не стане більше ніж на 3 одиниці вище ізоелектричної точки. На думку авторів [95], зміна конфігурації альбуміну з рН більш за все пов'язана не з дисоціацією будь-яких конкретних побічних ланцюгів, а з набуханням або розгортанням, яке індуковане сильним внутрішнім електростатичним відштовхуванням у білковій молекулі в результаті зростання її негативного заряду.

1.4.2 Взаємодія органічних сполук з ДНК і білками

Взаємодія невеликих органічних молекул з ДНК і білками є широкою областю досліджень, котрій присвячена значна кількість наукових публікацій. У даному підрозділі розглянуто роботи, що стосуються взаємодії ДНК та білків з органічними сполуками, які безпосередньо були задіяні у експериментах даної дисертації.

Дослідження електрофоретичної рухливості ДНК у трис-ацетатному буфері [96] показало, що молекули ДНК не взаємодіють з іонами Трис. Електрофоретичні рухливості ДНК в трис-ацетатному буфері і в розчинах NaCl з аналогічними концентраціями виявилися дуже схожими, що свідчить

про те, що іони Трис і іони Na^+ екранують заряд на фосфатних залишках ДНК в аналогічній мірі.

У роботі [97] флавінаденіндинуклеотид (ФАД) і флавінмононуклеотид (ФМН) були використані як зовнішні маркери флуоресценції для зондування мікрогетерогенного середовища САЛ. Флуоресцентна спектроскопія стаціонарного стану та з розділенням в часі показали, що ФМН і ФАД зв'язуються з карманом зв'язування SS1 САЛ, де знаходиться Trp214. З іншого боку, тільки мала частка молекул рибофлавіну зв'язується з SS1, в той час як інша частка молекул рибофлавіну залишається незв'язаними або поверхнево зв'язаними з білком. Автори [97] роблять висновок, що гасіння флуоресценції флавінів за допомогою САЛ найбільш вірогідно викликане перенесенням електрона між триптофаном і флавіном, що може відігравати важливу роль в процесі зв'язування.

У роботі [98] метод зовнішньої гель-хроматографії був використаний для вивчення взаємодії бичачого сироваткового альбуміну з самоасоційованими флавінами. При рН 5.8 спорідненість альбуміну до флавінів зростає в такому порядку: ФАД, рибофлавін, ФМН і люміфлавін, причому ФМН конкурентно пригнічує зв'язування ФАД з альбуміном. Було показано, що спорідненість до ФМН зменшується для БСА і збільшується для САЛ при рН 9,0, що пояснюється спостережуваним насиченням в ліганд-білкових взаємодіях, яке передбачене моделлю, де флавіни зазнають ізодесмічної необмеженої самоасоціації і один мономер зв'язується з одним сайтом зв'язування альбуміну. Автори [98] роблять висновки, що ізоалоксазінова кільцева частина флавіна взаємодіє з сайтом зв'язування альбуміну. При цьому рібутілові бічні ланцюги знаходяться в стерічному конфлікті з альбуміном поблизу ділянки зв'язування для ізоалоксазінового кільця і середовище рібітілових бічних ланцюгів на флавін-зв'язуючому сайті змінюється в залежності від рН.

1.4.3 Вплив температури і радіації на білки

На відміну від чинників хімічної природи, дія фізичних факторів на сольові розчини біополімерів дозволяє зв'язати зміну текстур на отриманих плівках виключно з конформаційними, структурними або іншими змінами безпосередньо самого біополімеру. У даному підрозділі наведено огляд сучасного розуміння змін, які відбуваються з білком при різних рівнях температурної обробки та дозах гамма-опромінення.

У роботі [99] було встановлено, що термічна обробка альбуміну збільшує частку α - і β - структур і агрегатів. При ступені денатурації до 20% можлива повна ренатурація в кожному випадку. Однак розгортання карману, який містить SH-вільну групу цистеїну-34, робить можливим формування дисульфідних містків, що призводить до стабільних агрегатів і незворотних структурних змін. Зв'язування N-етілмалеїміду з SH-вільними групами блокує утворення дисульфідних містків, що дозволяє запобігти агрегації і незворотнім конформаційним змінам.

Протеїнові макромолекули – це складні структури з численними групами, які можуть бути модифіковані під впливом іонізуючого випромінювання та є біологічними об'єктами з високою радіаційною чутливістю [100]. Оскільки опромінення білкового розчину призводить до змін у структурі білкових молекул [101–103], це повинно впливати на формування текстури плівки. Наприклад, у [104] було показано, що γ -опромінення розчинів ізолятів соєвого білка змінює властивості плівок, отриманих з цих розчинів.

Вплив іонізуючого випромінювання на біополімери є предметом численних робіт [101, 105–107]. Радіоліз води призводить до утворення радикалів $\text{H}_2\text{O}^\bullet$, H_2O^+ , OH^+ , H^- , H^+ , O^+ , O^- [108], а також біологічно значимих кисневих радикалів: $^\bullet\text{OH}$ (гідроксильний радикал), O_2^- (супероксидний аніонний радикал) та HO_2^\bullet (гідродіоксильний радикал, який може мати обмежене біологічне значення) [109]. Згідно [109], $^\bullet\text{OH}$ викликає агрегацію білків; O_2^- сам по собі не має очевидних ефектів, але у комбінації з $^\bullet\text{OH}$ та O_2

(тобто $\cdot\text{OH} + \text{O}_2^- + \text{O}_2$) викликає фрагментацію білка. $\cdot\text{OH}$ та, меншою мірою, $\cdot\text{OH} + \text{O}_2^- + \text{O}_2$ призводять до втрати триптофану, продукування бітирозину та зміни електричного заряду.

Агрегація білка також залежить від навколишнього середовища. Наприклад, етанол, метанол та інші полярні водорозчинні розчинники зменшують водяну оболонку навколо протеїну та діелектричну константу розчину, що збільшує електростатичну взаємодію між молекулами БСА [110]. Насиченість розчину БСА радіаційно активними газами (наприклад, O_2 , C_2H_2) перед опроміненням також має незначний вплив на агрегацію [110]. Неорганічні солі також можуть грати роль, оскільки іони в розчині можуть створювати осмотичні сили, що руйнують бар'єр гідратації, який запобігає агрегації білка [111].

Вплив іонізуючого опромінювання залежить від дози. Як правило, зміна локального середовища поліпептидних ланцюгів спостерігається нижче 0,5 кГр [101], фрагментація білків (розщеплення пептидних зв'язків) вище 1 кГр [101, 112, 113] і агрегація (через ковалентне зшивання, гідрофобні та електростатичні взаємодії і утворення зв'язків бітирозину та цистеїну) вище 5 кГр [101, 109, 112–114].

За даними SDS-PAGE (додецилсульфат натрію - поліакриламідний гелелектрофорез), пошкодження БСА має логарифмічну залежність від дози (10-20% при 0,2 кГр, 50-60% при 1 кГр) [106], і навіть при 2,5 кГр ще залишається деяка кількість неушкодженого БСА [115]. З іншого боку, багатокутове розсіювання світла показує різке зменшення молекулярної ваги БСА від 0,5 до 1 кГр [101]: 73 кДа при 0 і 0,5 кГр, 45 кДа при 1 і 5 кГр. Розмір частинок БСА (виміряний методом динамічного розсіювання світла) становить 6,6 нм при 0 кГр [114, 116], значно не змінюється при 2,5 кГр [116], 8,8 нм при 5 кГр [116], 12,4 нм при 7,5 кГр [116] та 16,6 нм при 10 кГр [114, 116].

Окрім фрагментації та агрегації, є також зміни у вторинній структурі БСА. Зменшення вмісту α -спіралей [112, 117], збільшення вмісту

β -складчастих листів [112, 117] та статистичних клубків [112] і перетворення β -поворотів на β -аркуші [101] зазвичай стають помітними при 1 кГр. Втім, деякі автори повідомляють про зміну вторинної структури, поверхневого заряду та гідродинамічного розміру (від 36,74 нм до 47,89 нм) навіть при 5 Гр [118].

Вплив БАР неорганічної та органічної природи, а також фізичних чинників на ДНК, білки та інші біополімери досліджується різними авторами впродовж багатьох років. Однак автори не ставили завдання зв'язати відповідні зміни властивостей і параметрів біополімерів в розчині з характером текстур, які утворюються при їхньому висиханні.

Висновки до розділу 1

1. Розглянуто існуючі теоретичні моделі процесів при висушуванні крапель біорідин та розчинів біополімерів.

2. Проаналізовано експериментальні роботи, у яких спостерігалися різні типи текстур на плівках, отриманих з колоїдних розчинів. Визначено фактори та умови, що можуть впливати на вид отримуваних текстур, зокрема зигзагоподібних (гексагональних) патернів.

3. Розглянуто підходи до кількісного аналізу текстур плівок, які застосовувалися іншими авторами.

4. Наведено огляд літературних джерел, присвячених дослідженню впливу неорганічних речовин, органічних сполук та фізичних чинників на ДНК і білки.

5. Визначено аспекти досліджень плівок біополімерів, яким у публікаціях інших авторів не було приділено достатньо уваги.

Таким чином, для встановлення взаємозв'язку стану біополімеру з кількісними параметрами текстур на поверхні висушеної плівки, в представленій дисертаційній роботі були поставлені і вирішені такі завдання.

1. Розробити новий метод чисельної характеристики текстур, який є чутливим до конкретного типу текстур.

2. За допомогою методів оптичної мікроскопії, обробки цифрових зображень, аналізу текстур та статистичного аналізу встановити чутливість запропонованих характеристик текстур до різних експериментальних параметрів (концентрації домішок та сили дії фізичних чинників на вихідні розчини біополімерів).

3. Для встановлення внеску води, солі та біополімеру у формування зигзагоподібних патернів дослідити розчини БСА з різними галогенідами натрію методами спектроскопії УФ-поглинання, флуоресцентної спектроскопії та мікрохвильової діелектрометрії.

4. Методами ІЧ- та УФ-поглинання, флуоресцентної спектроскопії та мікрохвильової діелектрометрії виявити механізми впливу домішок іонів металів на текстури отриманих плівок.

5. За допомогою методів спектроскопії УФ-поглинання та флуоресцентної спектроскопії дослідити вплив структурного стану біополімеру при термічній обробці та гамма-опроміненні на параметри текстур плівок.

6. На основі результатів проведених досліджень встановити область застосування розробленого методу оцінки впливу біологічно активних речовин на біополімери.

РОЗДІЛ 2

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ МЕТОДИ ВИЗНАЧЕННЯ СТАНУ БІОПОЛІМЕРІВ (ДНК, БСА) ТА МЕТОДИ КІЛЬКІСНОЇ ХАРАКТЕРИЗАЦІЇ ЇХНІХ ТЕКСТУР

Щоб вирішити поставлені завдання, були використані запропонований раніше спосіб отримання плівок [3, 4], методи інфрачервоної і ультрафіолетової спектроскопії, флуориметрії, динамічного розсіювання світла, діелектрометрії в надвисокочастотному діапазоні довжин хвиль, а також стандартні і нові методи чисельної характеристики текстур [1, 2, 5, 6, 11-13, 18].

Отримання та аналіз плівок здійснювалися з використанням розроблюваного у відділі біофізики ІРЕ НАН України програмно-апаратного комплексу "ТЕКСТУРА-1", компоненти якого (вакуумний, фотографувальний і алгоритмічний) дороблялися у ході виконання дисертації.

2.1 Приготування вихідних розчинів

Для приготування плівок та для вимірювань поглинальної і флуоресцентної спектроскопії використовувалися розчини біополімерів (ДНК або білка) та солі (хлориду натрію) у дистильованій воді. Експериментально було встановлено [63, 119], що для формування текстур на плівках оптимальними є такі концентрації:

- 0,2 мг/мл (23 нМ) Na-ДНК тимуса теляти (SERVA, Німеччина) + 10 мМ NaCl (хімічно чистий)
- 0,5 мг/мл (7,5 мкМ) БСА або САЛ (DiaM, США; Sigma-Aldrich, США) + 20 мМ NaCl (хімічно чистий)

Приготовлені розчини перемішувались протягом 2–3 год. на механічній мішалці при кімнатній температурі.

Для вимірювань НВЧ-діелектрометрії використовувалися розчини з 20-кратно збільшеною концентрацією біополімеру та солі.

2.2 Методика приготування плівок і конструкція сушильної установки

0,5 мл досліджуваного розчину заливається в квадратну скляну кювету розміром $20 \times 20 \times 1 \text{ мм}^3$. Для рівномірного висихання розчин в кожній кюветі розтягувався до країв кювети (так, щоб весь її об'єм заповнився). Кювета та пакет з сілікагелем (для прибирання парів води) розміщуються в герметичному контейнері, кришка якого містить вводи для викачування повітря. Після цього контейнер ставиться в терморегульовану сушильну камеру TX-50 і підключається до насоса (рис. 2.1). Під час висушування температура складає $40 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$, відносна вологість – $5 \pm 3\%$, повітряний тиск – $0,5 \pm 0,1 \text{ атм}$.

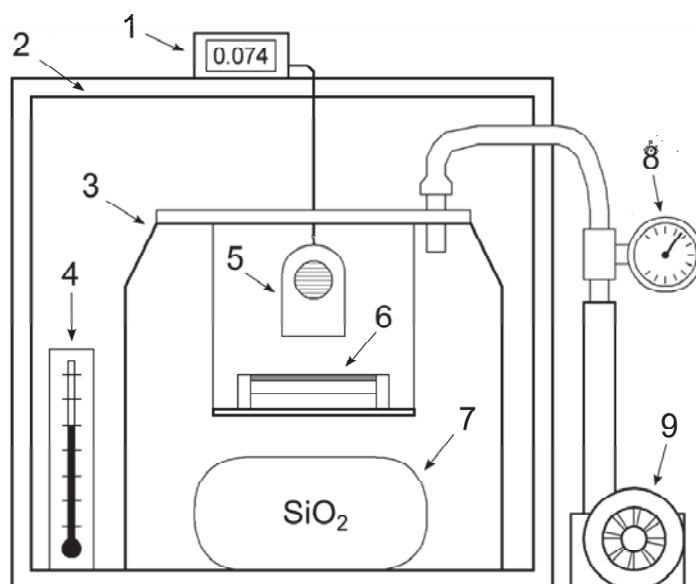


Рисунок 2.1. Схема установки для отримання плівок. 1 – вимірювач імітансу; 2 – водяний термостат; 3 – герметичний контейнер; 4 – термометр; 5 – датчик ємності; 6 – кювета з розчином; 7 – пакет з сілікагелем; 8 – датчик тиску; 9 – вакуумний насос.

2.3 Методи контролю структурного стану біополімеру

2.3.1 Інфрачервона абсорбційна спектроскопія

Контроль структурного стану ДНК в плівках здійснювався за допомогою ІЧ спектроскопії в області $900\text{-}1850 \text{ см}^{-1}$, де розташовані реперні смуги поглинання, чутливі до конформації цукрофосфатного остова і азотистих основ ДНК.

У результаті дегідратації ДНК (наприклад, при висушуванні плівок) її спіральна структура порушується [120, 121], однак при зволоженні плівок ДНК до 92% відносної вологості (ВВ) спіральна структура відновлюється (переходить в В-форму), що проявляється на ІЧ спектрах плівок. Утворення смуги при $\nu = 1712 \text{ см}^{-1}$ свідчить про те, що азотисті основи сформували правильну міжпарну стопочну структуру В-форми ДНК; формування смуги антисиметричного коливання фосфатів при $\nu = 1224 \text{ см}^{-1}$ і дезоксирибозної смуги при $\nu = 1053 \text{ см}^{-1}$ також свідчить про те, що сформувався цукрофосфатний ланцюг В-форми ДНК.

ІЧ спектри плівок ДНК були отримані за допомогою двопроменевого спектрофотометра UR-20 (Carl Zeiss, ГДР). Використовувалася призма NaCl з роздільною здатністю 6 см^{-1} при 1600 см^{-1} . Плівки були отримані на флюоритових підкладках. Зволоження плівок проводили за стандартними методиками в герметичній кюветі з використанням насичених розчинів солі [4, 120, 121].

2.3.2 Ультрафіолетова абсорбційна спектроскопія

Нативність структури ДНК можна визначити за УФ спектрами поглинання. Азотисті основи поглинають у області довжин хвиль $\lambda = 260 \text{ нм}$, і зростання інтенсивності цієї смуги свідчить про руйнування вторинної спіральної структури ДНК.

Для спектрів УФ-поглинання білків найбільш характерними є смуги поглинання з максимумами при 280 нм (область поглинання триптофану і тирозину) і при 260 нм (область поглинання фенілаланіну і гістидину). Зміна інтенсивності в максимумі цих смуг вказує на структурні зміни білкових молекул.

Отримування спектрів УФ поглинання здійснювалося за допомогою спектрофотометра Hitachi U2310 (Hitachi, Ltd, Токіо, Японія) у діапазоні довжин хвиль 240-450 нм.

2.3.3 Флуориметрія

Для оцінки структурного стану білка у розчинах та плівках БСА також використовувалися спектри флуоресценції (пік флуоресценції триптофану знаходиться в діапазоні 300-350 нм, в залежності від полярності локального середовища).

Спектри флуоресценції були отримані в діапазоні довжин хвиль 290-460 нм за допомогою спектрофлуориметра Hitachi 850 (Hitachi, Ltd, Токіо, Японія), зі збудженням на довжині хвилі 280 нм. Оскільки текстури на плівках призводять до значного розсіювання світла (що спотворює форму спектральних кривих), спектри флуоресценції плівок реєстрували з використанням високочастотного фільтра на 290 нм.

Відносні інтенсивності флуоресценції зразків (I') приблизно оцінювалися за допомогою порівняння значень, отриманих шляхом ділення інтенсивності флуоресценції в максимумі смуги випромінювання БСА (I_{\max}^{fl}) на оптичну густину в максимумі смуги поглинання БСА при $\lambda = 280$ нм (A_{exc}):

$$I' = I_{\max}^{fl} / A_{exc} \quad (2.1)$$

2.3.4 Динамічне та електрофоретичне розсіювання світла

Для оцінки розміру часток білка застосовувався метод динамічного розсіювання світла (ДРС), а для оцінки електрокінетичного потенціалу білка – метод вимірювання ζ -потенціалу.

Для вимірювань ДРС використовувався прилад Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd.), обладнаний He-Ne лазером (633 нм). Всі вимірювання проводились при 298 К в квадратних полістирольних кюветах або U-подібних капілярних кюветах.

Експериментальні дані були проаналізовані програмним забезпеченням Zetasizer (версія 7.12), з використанням загальної моделі аналізу.

ζ -потенціали визначали за допомогою методу дифузійного бар'єру [122] для запобігання агрегації білка на електродах. Для розрахунків використано рівняння Смолуховського [123].

2.3.5 НВЧ діелектрометрія

Дійсна ϵ' і уявна ϵ'' частини комплексної діелектричної проникності розчину БСА (10 мг/мл), розчинів галогенідів натрію NaF, NaCl і NaBr (0,4 М) і систем вода-БСА-сіль (10 мг/мл БСА і 0,4 М солі) вимірювалися за допомогою методу НВЧ-діелектрометрії [124] на частоті 9,2 ГГц і при температурі $22,9\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Поправки на присутність неорганічних іонів були зроблені на основі вимірів провідності при частоті 1 кГц. Частота діелектричної релаксації f_d ($f_d = 1 / (2 \pi \tau)$, де τ – час релаксації) молекул води в розчинах, а також статична діелектрична проникність ϵ_s (діелектрична проникність розчину в низькочастотній області релаксації води) були розраховані, виходячи з виміряних значень ϵ' і ϵ'' , за допомогою виразів, отриманих з рівняння Дебая [125]:

$$f_d = \frac{f(\epsilon' - \epsilon_{\infty})}{\epsilon''}, \quad (2.2)$$

$$\epsilon_s = \epsilon' + \frac{\epsilon'^2}{(\epsilon' - \epsilon_{\infty})}, \quad (2.3)$$

де f – частота НВЧ поля і $\epsilon_{\infty} = 5.6$ – діелектрична проникність води в інфрачервоному діапазоні частот [126].

2.3.6 Вимірювання рН

Для визначення рН розчинів був використаний рН-метр "рН-150МИ" ("Вимірювальна техніка", Москва).

2.4 Фотографування плівок

Для отримання загальних фотографій використовувався плівковий фотоапарат Зеніт-3М та сканер фотоплівок.

Для зйомки мікрофотографій використовувалися мікроскоп Meopta (Meopta - Optika, s. r. o., Чехія) з веб-камерою Logicfox LF-PC011 та

спеціально розроблене програмне забезпечення. Для кожної плівки робилося 100 мікрофотографій, рівномірно розподілених по площі кювети (за принципом квадратної сітки 10x10). Зйомка мікрофотографій виконувалась у 10-кратному наближенні (діаметр видимої ділянки плівки – 0,726 мм).

2.5 Аналіз текстур плівок

2.5.1 Загальні положення методу аналізу текстур

У основу розроблюваного методу покладено емпіричне спостереження, що текстури на плівках, які формуються у результаті висихання сольових розчинів біополімерів, змінюють свій характер при впливі хімічних або фізичних факторів на розчин.

На основі цього спостереження можна сформулювати кінцеву мету методу наступним чином: поставити у відповідність зовнішньому вигляду отриманої плівки силу та характер дії досліджуваного чинника. Для цього необхідно мати певну інтегральну оцінку усієї плівки, яку було б легко порівнювати за величиною.

Прикладом такої оцінки може виступати ступінь заповненості плівки текстурами (неоднорідностями, які поглинають або розсіюють світло), для визначення якої достатньо підрахувати відношення сумарної інтенсивності елементів зображення до площі усієї плівки на її загальній фотографії:

$$K_{B.I.T.} = \sum_{x,y} I_{x,y} / \sum_{x,y} 1 \quad [x, y \in \text{плівці}], \quad (2.4)$$

де $K_{B.I.T.}$ – ступінь заповненості плівки текстурами, x, y – координати пікселя, а $I_{x,y}$ – його яскравість.

Цей критерій малочутливий до розміру та чіткості зображення, але не дозволяє розрізнити ділянки плівки з різними типами текстур, а також, як

показали експерименти, має дуже незначну залежність від сили дії досліджуваного впливу.

Інші характеристики текстур, такі як фрактальна розмірність або щільність певного типу патернів (наприклад, зигзагоподібних структур), потребують аналізу плівки на рівні десятків-сотень мікрометрів. Вони теж, з принципіальної точки зору, можуть бути застосовані до зображення усієї плівки і теж, у цьому випадку, дадуть одне конкретне число, яке можна використати як інтегральну оцінку. Але у випадку відсутності обладнання та програмного забезпечення, яке могло б повністю автоматизувати процес, отримання та обробка повного зображення плівки у необхідному масштабі вимагає надзвичайно великих затрат часу та зусиль.

У ситуаціях, коли дослідження усього об'єкта не можна здійснити на практиці, для оцінки його характеристик можна застосувати статистичний аналіз результатів вимірювань, зроблених у скінченній кількості точок. У даному випадку плівку можна представити як двовимірну функцію розподілу неоднорідностей $I(x, y)$ з обмеженою областю визначення. Зйомка мікрофотографій, відповідно, дозволяє отримати n локальних зразків цієї функції у вікнах радіусу R .

Для обладнання, яке застосовувалося у проведених експериментах, розмір плівки дорівнює розміру кювети і складає $20 \times 20 \text{ мм}^2$, а радіус видимої ділянки плівки при відповідному збільшенні мікроскопа складає $0,363 \text{ мм}$. Мінімальна кількість мікрофотографій, необхідних для покриття усієї плівки, отже, становить

$$N_{\text{cover}} = \left\lceil \frac{S_x}{\sqrt{2}R} \right\rceil \cdot \left\lceil \frac{S_y}{\sqrt{2}R} \right\rceil = \left\lceil \frac{20}{\sqrt{2} \cdot 0.363} \right\rceil \cdot \left\lceil \frac{20}{\sqrt{2} \cdot 0.363} \right\rceil = 1521, \quad (2.5)$$

де S_x, S_y – ширина та довжина кювети, відповідно.

Кількість мікрофотографій, достатня для складення загального враження про розподіл текстур на плівці, залежить від властивостей цього розподілу.

Утворення патернів агрегації при висиханні колоїдного розчину обумовлюється як добре повторюваними глобальними (загальна динаміка висихання, перенос часток внаслідок дифузії та течій), так і хаотичними локальними чинниками (локальні властивості субстрату, орієнтація зародків кристалів, флуктуації фізико-хімічних параметрів на пізній стадії висихання). Таким чином, формування текстури певного типу T у заданому місці плівки не є детермінованою подією, і вірогідність цієї події можна записати як

$$P_T(x, y) = P_T^{global}(x, y) \cdot P_T^{local}(x, y), \quad (2.6)$$

де P_T^{global} – вірогідність утворення текстури T в залежності від глобальних чинників у даній точці, а P_T^{local} – вірогідність утворення текстури T в залежності від локальних чинників у даній точці.

Оскільки локальні чинники визначаються тільки кінцевим етапом процесу висихання (який є дуже чутливим до початкових умов, тобто хаотичним) і місцевими параметрами субстрату (який є доволі однорідним), то P_T^{local} можна вважати незалежною від просторових координат. Відповідно, статистичний розподіл текстури типу T по плівці буде змінюватися так само плавно, як і розподіл глобальних факторів процесу висихання. Це означає, що, згідно з теоремою відліків Найквіста-Шеннона [127], для його реконструкції достатньо покрити плівку сіткою мікрофотографій, розташованих вдвічі більш щільно, ніж характерний просторовий період зміни глобальних чинників.

Експериментальні дослідження показали, що мінімальна щільність зигзагоподібних патернів спостерігається на краях та у центрі плівки (10 мм від краю), а максимальна – посередині між центром та краями (5 мм від краю) [1]. Таким чином, для отримання розподілу цих текстур мікрофотографії повинні бути розташовані не далі одна від одної, ніж 2,5 мм. Виходячи з цього, було вирішено знімати фотографії у вузлах квадратної сітки (10 фотографій у ширину та 10 у висоту) з відстанню між рядками та

стовпчиками 2 мм. Відповідно, ці 100 мікрофотографій дозволяють обчислити параметри текстур для

$$A_{rel.vis.} = \frac{n \cdot \pi R^2}{S_X \cdot S_Y} = \frac{100 \cdot \pi \cdot 0.363^2}{20 \cdot 20} \approx \frac{41.4}{400} \approx 0.103 \approx 10\% \quad (2.7)$$

площі усієї плівки. Вважаючи у першому наближенні, що значення розглядуваного параметру для однієї фотографії з певною вірогідністю характеризує значення цього параметру для відповідного регіону 2x2 мм, для отримання інтегрального значення параметру (для усієї плівки) достатньо об'єднати дані окремих регіонів. У якості цих параметрів можуть бути використані такі характеристики текстур, як фрактальна розмірність та щільність певного типу патернів.

У галузі просторового аналізу добре відомий той факт, що статистики, які обчислені, виходячи з середніх значень досліджуваних параметрів по географічним регіонам (кластерам), можуть суттєво відрізнятися від відповідних статистик, заснованих на даних окремих суб'єктів [128, 129]. Це відомо як проблема змінюваної одиниці площі (modifiable areal unit problem), і розбіжність між цими статистиками є результатом так званого агрегаційного ефекту.

У загальному сенсі, оцінки, отримані з сукупних даних, дійсні тільки для конкретної системи одиниць спостереження, що використовувалася [129]. Єдиним параметром, що залишається незмінним при агрегації даних, є точкова оцінка математичного сподівання досліджуваної величини [128], тоді як варіація, довірчий інтервал та інші параметри статистики не можуть бути узагальнені для інших рівнів масштабу. Втім, якщо систематично використовувати один і той же масштаб (розмір ділянки плівки, видимої на фотографії, у даному випадку) та процедуру спостережень, то параметри статистик окремих експериментів можна принаймні порівнювати між собою.

Для обробки зображень, а також аналізу та візуалізації даних використовувалися наукові пакети ImageJ, numpy, scipy та matplotlib.

2.5.2 Розрахунок площі текстур

Обчислення відносної площі текстур на плівці $S_{\text{відносна}}$ виконувалося таким чином (рис. 2.2, 2.3, 2.4):

1. У редакторі растрових зображень з оцифрованої фотографії кювети вирізається ділянка, що відповідає внутрішній площі кювети ($20 \times 20 \text{ мм}^2$);
2. Підраховується кількість пікселів $S_{\text{плівки}}$, що належать до цієї ділянки;
3. Підраховується сумарна інтенсивність пікселів $S_{\text{текстури}}$, що належать до цієї ділянки;
4. Величина відносної площі розраховується як $S_{\text{відносна}} = S_{\text{текстури}} / S_{\text{плівки}}$.

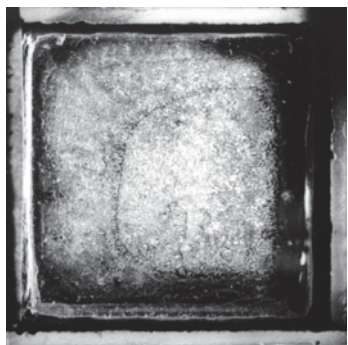


Рисунок 2.2. Загальна фотографія кювети.



Рисунок 2.3. Внутрішня площа кювети ($S_{\text{плівки}}$).

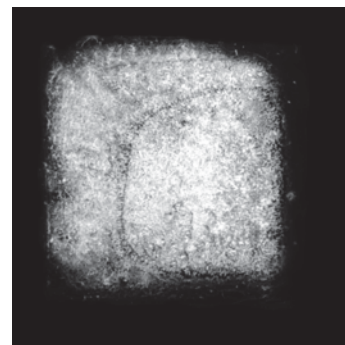


Рисунок 2.4. Текстура на плівці ($S_{\text{текстури}}$).

2.5.3 Розрахунок фрактальної розмірності текстур

Фракталом, згідно з визначенням Б. Мандельброта [130], є множина, розмірність Хаусдорфа-Безиковича якої строго більше її топологічної розмірності. Природні структури представляють собою квазіфрактали – стохастичні фрактали, повторюваність структури яких проявляється тільки в обмеженому діапазоні масштабів. Основний показник, який використовується у фрактальному аналізі – фрактальна розмірність D . Вона відображає характер зміни кількості деталей структури зі зміною масштабу.

Фрактальна розмірність може бути показником складності, неоднорідності або міри заповнення простору структурою. У загальному вигляді вона виражається у вигляді границі [131]:

$$D = \lim_{\varepsilon \rightarrow \infty} \frac{\log N_{\varepsilon}}{\log \varepsilon}, \quad (2.8)$$

де N - число елементів, достатніх для покриття структури (заповненої області на зображенні), ε - лінійний розмір елементів.

Перед обчисленням фрактальної розмірності спершу виконується попередня обробка мікрофотографій (віднімання фону і бінаризація). Приклад цих процедур проілюстрований на рис. 2.5, 2.6, 2.7.

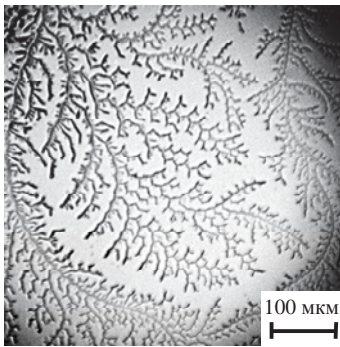


Рисунок 2.5. Вихідна мікрофотографія плівки.



Рисунок 2.6. Після віднімання фону.



Рисунок 2.7. Після бінаризації.

Для розрахунку фрактальної розмірності в більшості випадків застосовується метод підрахунку квадратів (розмірність Мінковського-Булінганда) [130]: для кожного значення ε із заздалегідь заданого ряду масштабів зображення покривається квадратною сіткою зі стороною квадрата ε (рис. 2.8); підраховується кількість квадратів N , які містять ділянку зображення, що належить структурі; будується залежність $\log(N)$ від $\log(\varepsilon)$ (рис. 2.9) і визначається регресійна пряма для цієї залежності.

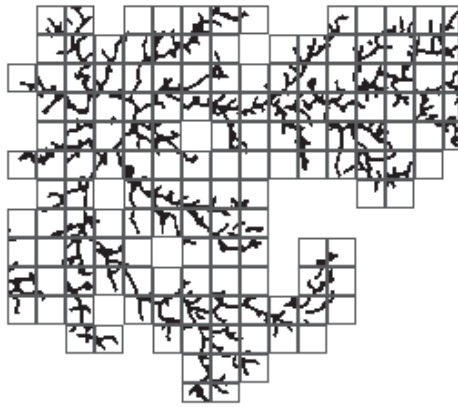


Рисунок 2.8. Структура,
покрита сіткою масштабу ε

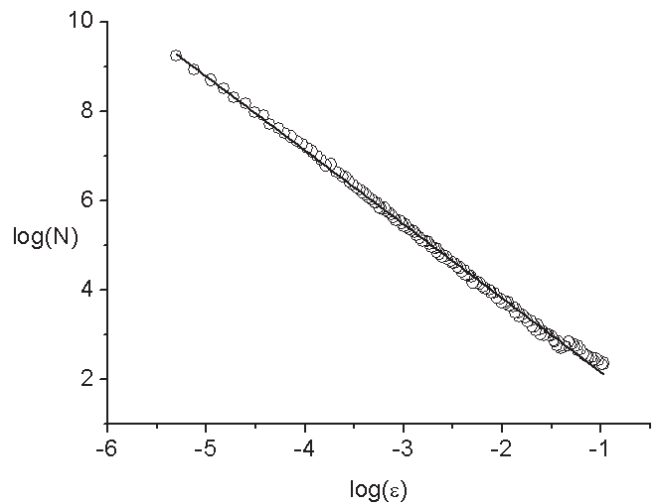


Рисунок 2.9. Залежність зміни кількості
деталей зі зміною масштабу.

Нахил регресійної прямої є шуканим значенням фрактальної розмірності D . Отримане значення D залежить від вибору початку координат сітки g , тому для підвищення точності усереднюються результати обчислень D для набору випадкових початкових координат.

У випадку, коли неможливо чітко розділити фон та структуру, може бути застосований різновид фрактальної розмірності, що враховує «інтенсивність» зображення:

$$D = \lim_{\varepsilon \rightarrow \infty} \frac{\log X(\varepsilon)}{\log \varepsilon}, \quad (2.9)$$

де X – певна кількісна характеристика змісту елементів.

Для розрахунку цієї фрактальної розмірності використовується метод підрахунку квадратів типу «варіація диференціального об'єму». Для кожного значення масштабу ε зображення покривається квадратною сіткою зі стороною квадрата ε і для кожного квадрата розраховується інтенсивність

$$I_\varepsilon = \sum_{i,j} [1 + \partial I_{i,j,\varepsilon}], \quad (2.10)$$

де $\delta I_{i,j,\varepsilon}$ – різниця між максимальною та мінімальною «інтенсивностями» зображення у межах даного квадрата.

I_ε відповідає «об'єм» $V_\varepsilon = I_\varepsilon \cdot \varepsilon^2$. Будується залежність $\log(V)$ від $\log(\varepsilon)$ і нахил регресійної прямої, відповідно, розраховується як

$$S = \lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \frac{\ln V_\varepsilon}{\ln 1/\varepsilon}, \quad (2.11)$$

а фрактальна розмірність – за формулою

$$D = 3 - (S/2). \quad (2.12)$$

Щоб оцінити фрактальну розмірність текстури для усієї плівки, кількість або інтенсивність квадратів для кожного масштабу підсумовується по усім мікрофотографіям, і нахил регресійної прямої знаходиться для отриманих сумарних значень.

2.5.4 Обчислення характеристик зигзагоподібних патернів

Як показано у роботі [132], на плівках, отриманих із сольових розчинів нативних ДНК або білка, утворюються зигзагоподібні (гексагональні) патерни, аналогічні тим, що спостерігались в [46, 54, 56]. Якщо ж структура біополімеру порушується (наприклад, внаслідок значних фізичних або хімічних впливів), ці патерни не формуються [1, 2].

Найбільш вірогідно, вони є результатом кристалізації в поперемінних кристалографічних напрямках [54, 62]. Ці структури (рис. 2.10) складаються зі сполучених між собою прямолінійних сегментів довжиною L_i , кожна пара яких знаходиться під кутом θ_{ij} один до одного (i, j – сусідні сегменти).

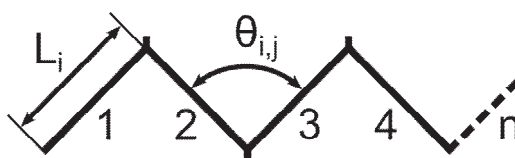


Рисунок 2.10. Елементи зигзагоподібної структури. L – довжина сегмента, θ – кут між сусідніми сегментами, n – кількість сегментів.

Ще однією важливою характеристикою є щільність патернів (наскільки щільно вони покривають поверхню плівки), яку можна охарактеризувати через кількість сегментів зигзагів або сумарну довжину зигзагів на заданій ділянці плівки. На рис. 2.11 показані фотографії, що ілюструють різноманіття цих параметрів для плівок, отриманих з ідентичних розчинів БСА при однакових умовах.

На ранніх етапах досліджень для характеристики кількості Z-патернів використовувалася відносна площа зигзагів S_Z (площа мінімального обмежуючого багатокутника, який містить видимі елементи Z-структур, віднесена до площі фотографії). Але цей показник не бере до уваги щільність Z-структур і наявність інших видів патернів всередині виділеної області.

Для обчислення характеристик зигзагоподібних патернів від растрового представлення зигзагів (зображення) необхідно перейти до векторного (де зигзагоподібна структура є графом з'єднаних між собою прямих відрізків). Для цього на кожній мікрофотографії відмічалися сегменти зигзагів у спеціально розробленому програмному забезпеченні.

На основі цих даних для окремої фотографії або для усієї плівки можуть бути розраховані такі характеристики зигзагоподібних патернів:

- Кількість сегментів зигзагів L_{count}
- Сумарна довжина зигзагів L_{sum}
- Середня довжина зигзагів L_{mean}
- Середній кут між зигзагами θ_{mean}

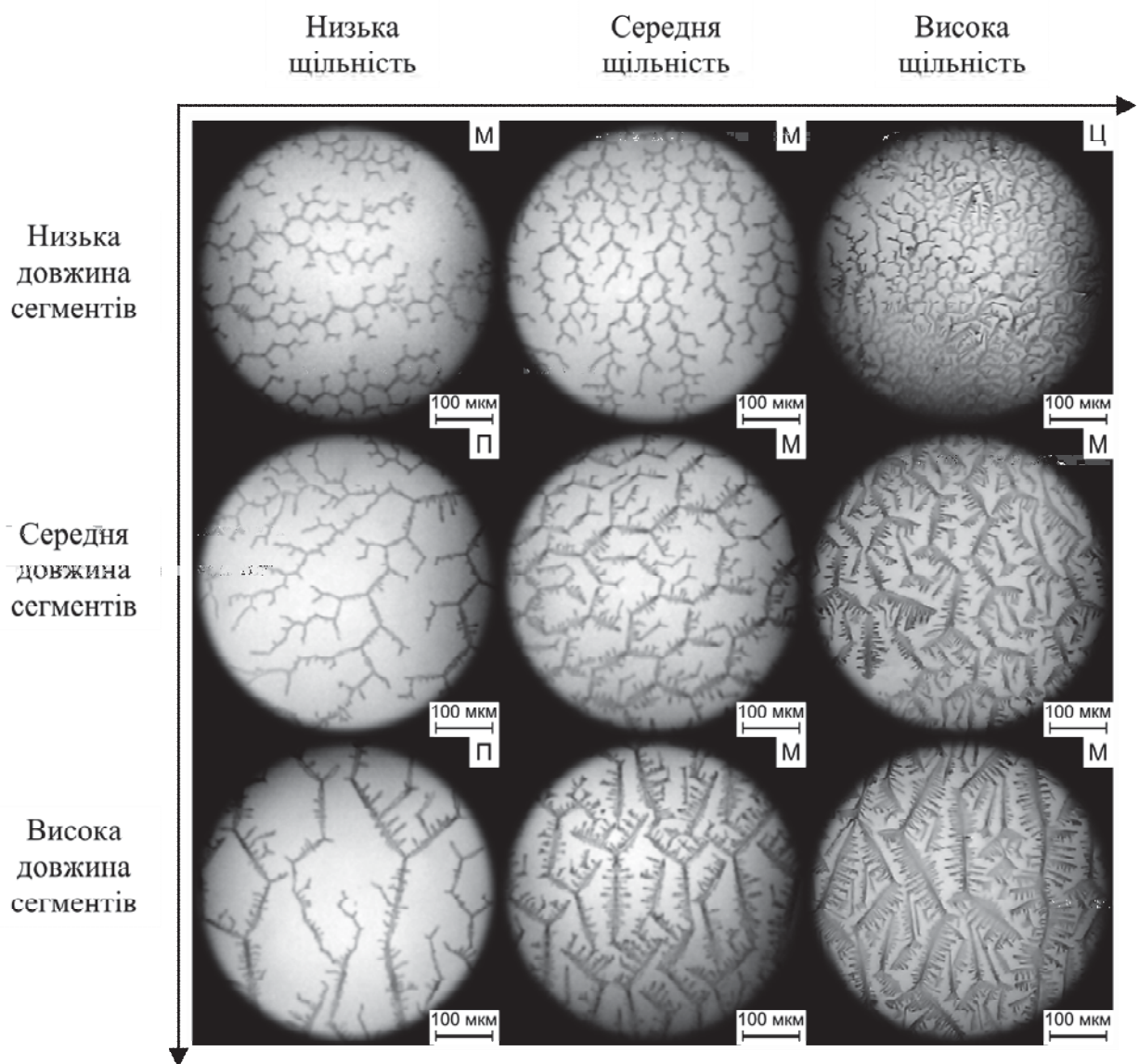


Рисунок 2.11. Фотографії зигзагоподібних патернів на поверхні плівок БСА з різними довжинами сегментів та щільності патернів. Всі плівки були отримані з контрольних розчинів; буква в верхньому правому куті кожної фотографії вказує на те, чи була зроблена фотографія в центрі плівки (Ц), на периферії (П) або між центром і периферією (М).

Оскільки в наших експериментах для усіх плівок робиться 100 мікрофотографій, L_{count} та L_{sum} можна безпосередньо порівнювати між собою, але для загального випадку краще використовувати величини, віднесені до сумарної площі усіх мікрофотографій. В більшості наших експериментів для цієї мети використовувалася величина L_{specific} (питома довжина сегментів зигзагів). Для окремої фотографії питома довжина сегментів розраховується як

$$L_{specific(p)} = \frac{1}{S_p} \sum_{i=1}^{n_p} L_{i(p)}, \quad (2.13)$$

де $L_{i(p)}$ – довжина i -го сегмента на фотографії p , n_p – кількість сегментів зигзагів на фотографії p , S_p – площа фотографії p .

Для усієї плівки

$$L_{specific} = \frac{1}{N} \sum_{p=1}^N L_{specific(p)} = \frac{L_{sum}}{S_p \cdot N} = \frac{L_{mean} \cdot L_{count}}{S_p \cdot N}, \quad (2.14)$$

де N – кількість фотографій.

В усіх проведених експериментах $S_p = 0,414 \text{ мм}^2$ та $N = 100$.

2.5.5 Статистичний аналіз характеристик зигзагоподібних патернів

Характеристики зигзагів мають випадковий характер внаслідок хаотичної сутності процесу і залежать від концентрації солі, концентрації біополімеру, умов приготування та сушіння розчину (температура, вологість, матеріал субстрату та шорсткість), а також властивостей біополімеру, солі та розчинника.

З практичної точки зору, розкид характеристик зигзагів може бути викликаний як недостатньою точністю контролю експериментальних умов (ступінь чистоти кювети, однорідність розчину, нахил кювети під час висихання), так і хаотичним характером процесу формування текстури. Автори робіт [29, 70] вважають, що останній варіант має місце, оскільки вони також повідомляють про низьку відтворюваність і високу мінливість результатів методу біокристалізації. Згідно з їх аналізом, стадія кристалізації є основним джерелом мінливості результатів.

Внаслідок сильних фізичних або хімічних впливів, що порушують структуру біополімеру, зигзагоподібні патерни на висушених плівках не

утворюються. Однак через значну дисперсію в значеннях характеристик зигзагів в межах однієї дози впливу [1, 133] достовірні відмінності між меншими рівнями впливу зазвичай важко визначити. У зв'язку з цим було також проаналізовано розширену серію характеристик зигзагоподібних патернів на поверхні плівок БСА, включаючи параметри їх статистичних розподілів, щоб з'ясувати, які з них найбільш чутливі до дії різних фізичних та хімічних факторів.

Плівки, отримані в наших експериментах, мають площу $20 \times 20 \text{ мм}^2$. Фотографії патернів (100 фотографій для кожної плівки) разом покривають близько 10% площі плівки, що дає достатню вибірку для оцінки статистичних розподілів характеристик зигзагів.

На рис. 2.12 і рис. 2.13 наведені характерні гістограми розподілів довжин сегментів та кутів між сегментами зигзагів.

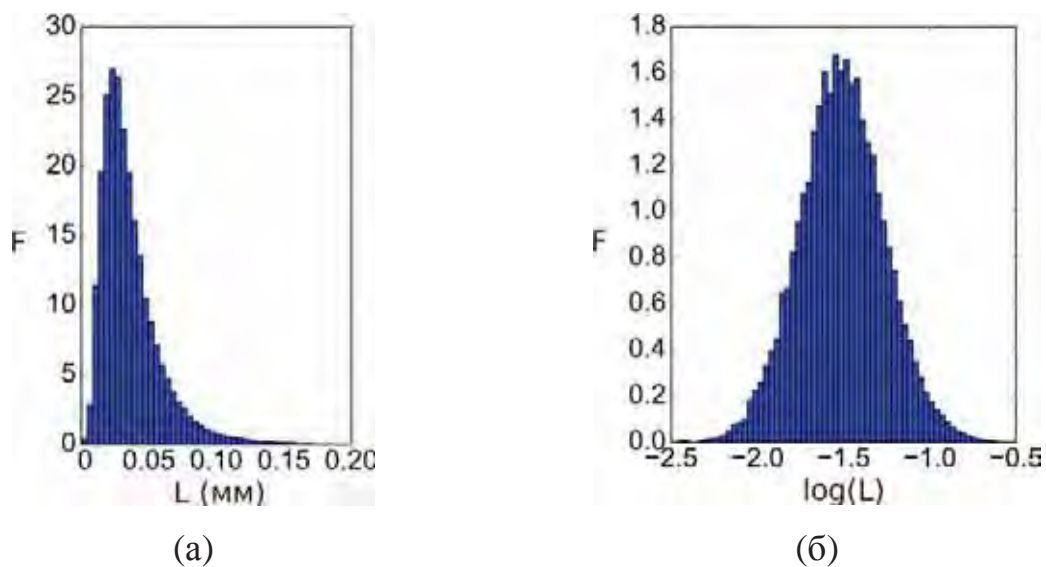


Рисунок 2.12. Розподіл довжини сегментів у лінійному (а) та логарифмічному (б) масштабах. Гістограми були створені з агрегованих даних всіх плівок, проаналізованих у роботі. F – відносна частота зустрічання, L – довжина сегментів.

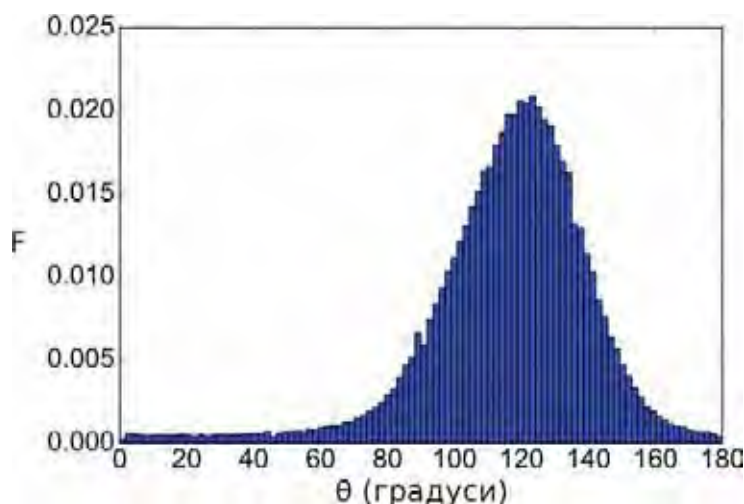


Рисунок 2.13 Розподіл кутів між зигзагоподібними сегментами. Гістограма була створена з агрегованих даних всіх плівок, розглянутих у [6]. F – відносна частота зустрічання, θ – кут між сегментами.

Методом підгону кривих було встановлено, що типовий розподіл довжин сегментів найближчий до логнормального розподілу (який, імовірно, відповідає моделі мультиплікативного зростання [134]), а типовий розподіл кутів найближчий до логістичного розподілу.

Були проаналізовані такі характеристики, як L_{count} (загальна кількість сегментів зигзагів), L_{sum} (загальна довжина сегментів), L_{mean} (середня довжина сегментів), θ_{mean} (середній кут між сегментами), а також параметри форми апроксимуючих функцій Burr^{XII} [135] та Inverse Weibull [136]

$$\text{Burr}^{12}(x, c, d) = c \cdot d \cdot x^{c-1} \cdot (1 + x^c)^{-d-1}, \quad (2.15)$$

$$\text{InvWeibull}(x, c) = c \cdot x^{-c-1} \cdot e^{-x^{-c}}, \quad (2.16)$$

де x – незалежна змінна (довжина сегмента в нашому випадку); c , d – параметри форми розподілу. Ці функції розподілу ймовірностей зазвичай використовуються для моделювання часу життя об'єктів у певному стані.

У роботі [2] також розглядалися такі параметри, як медіана усіх значень $L_{\text{specific}}(p)$ для фотографій, що містять Z-структури, та процент цих фотографій від їх загальної кількості (рис. 2.14).

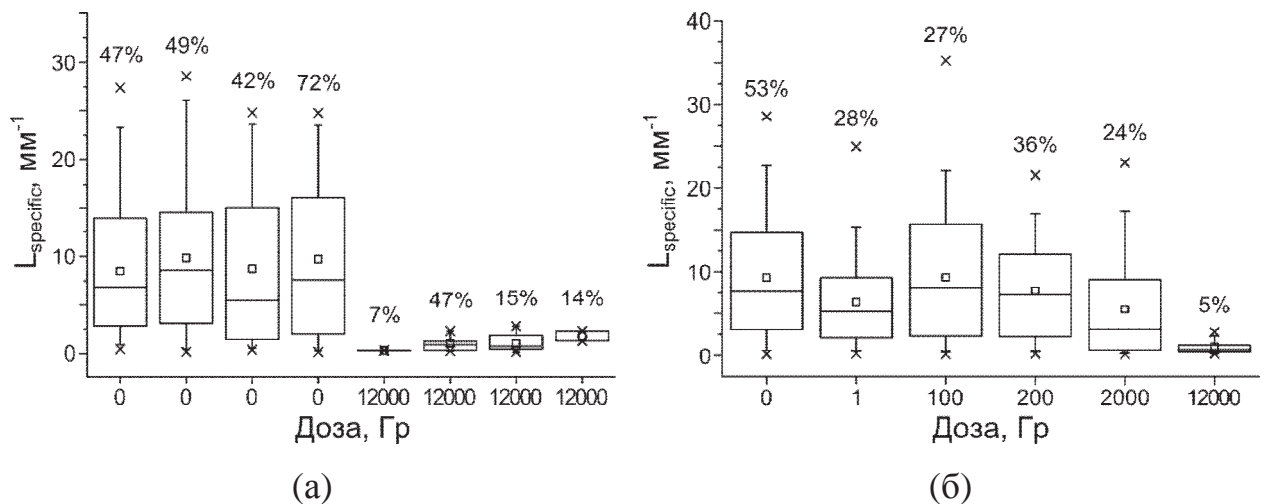


Рисунок 2.14. Коробковий графік розподілів $L_{specific}(p)$: (а) розподіл окремих плівок (контроль і 12 кГр); (б) комбіновані розподіли декількох плівок, відповідних кожній дозі. Над кожною коробкою вказано процент фотографій, що містили Z-структури. Позначення елементів коробкового графіка див. у додатку 2.

Найбільш інформативними серед розглянутих характеристик виявилися кількість сегментів зигзагів L_{count} та їхня середня довжина L_{mean} , а найменш інформативним – середній кут між сегментами. Інші параметри або корелюють з L_{count} чи L_{mean} , або не виявляють жодної залежності від сили досліджуваних факторів.

2.6. Моделювання процесу висушування плівки

Оскільки метод експериментального отримання плівок, використаний у даній роботі, суттєво відрізняється від стандартної методики (випаровування крапель розчину при кімнатних умовах), існуючі у літературі моделі перерозподілу компонентів розчину не можуть бути безпосередньо застосовані у даній ситуації. В зв'язку з тим, що квадратна геометрія кювети не дозволяє звести задачу до аксіально-симетричного двовимірного випадку, теоретичний аналіз проблеми значно ускладнюється, тому було проведено чисельне моделювання процесу випаровування [7, 16].

Як перше наближення, при моделюванні були зроблені такі припущення:

1. Наявні концентрації білка і солі не впливають на загальний хід гідродинаміки та випаровування: впродовж основного часу висихання масова доля БСА і NaCl в розчині є дуже низькою (близько 0,2–2%), що дозволяє не враховувати їхню дію на в'язкість, теплопровідність, поверхневий натяг та інші фізико-хімічні властивості розчинника і моделювати випаровування рідини окремо від перерозподілу частинок.

2. Пригнічення ефекту Марангоні: хоча теоретично внесок потоків Марангоні має бути помітним при випаровуванні крапель чистої води, на практиці їхній ефект дуже слабкий внаслідок залишкового забруднення поверхнево-активними речовинами [137].

3. Ігнорування ефекту пінінга (закріплення) лінії контакту до дна кювети (внаслідок складності моделювання цього феномену в пакеті OpenFOAM).

4. Відсутність агрегації частинок: наявна концентрація солі NaCl не настільки велика, щоб повністю компенсувати заряд БСА, тому при моделюванні вважалося, що агрегацією білка можна знехтувати.

2.6.1. Моделювання випаровування рідини у квадратній кюветі

Моделювання випаровування рідини виконувалося у пакеті моделювання суцільних середовищ OpenFOAM, що базується на методі скінченних елементів. Для обчислення гідродинамічних задач з розділом фаз цей пакет використовує метод об'єму рідини (volume-of-fluid), у якому кожному просторовому елементу обчислювальної області відповідає певне значення величини q , яке інтерпретується як ступінь заповненості цього елемента рідиною ($q = 1$ всередині рідини, $q = 0$ у повітрі). Для моделювання явищ переносу маси і теплоти, поверхневого натягу та фазового переходу використовувався модуль `interThermalPhaseChangeFoam` [138, 139], який вирішує рівняння збереження для маси (за допомогою рівняння Пуассона), імпульсу (з урахуванням в'язких сил, тиску, поверхневого натягу і сили

тяжіння), теплової енергії (з урахуванням конвекції та явищ теплопровідності) та об'єму рідини (з поправками для стискання поверхні розділу фаз і протидії чисельній дифузії).

Кювети, що застосовувалися при отриманні плівок, мали об'єм $20 \times 1 \times 20 \text{ мм}^3$. Оскільки початковий об'єм розчину – 0,5 мл, висота рідини може сягати 1,3 мм, тому було вирішено враховувати додатковий 1 мм повітря над кюветою. Для прискорення моделювання, обчислювальна область була задана як прямокутний об'єм розміром $10 \times 2 \times 10 \text{ мм}^3$ вздовж осей X, Y і Z відповідно (рис. 2.15), що відповідає 1/4 частині кювети. Цей об'єм було розділено на кубічні скінченні елементи розміром $0,1 \times 0,1 \times 0,1 \text{ мм}^3$ у вигляді тривимірної сітки (100x20x100 елементів вздовж відповідних осей).

Для задання граничних умов поверхня обчислювального об'єму була поділена на 4 ділянки: сторона XY, сторона YZ, поверхня нижче 1 мм ("кювета") і поверхня вище 1 мм ("повітря"). Граничні умови для цих ділянок наведені у табл. 2.1.

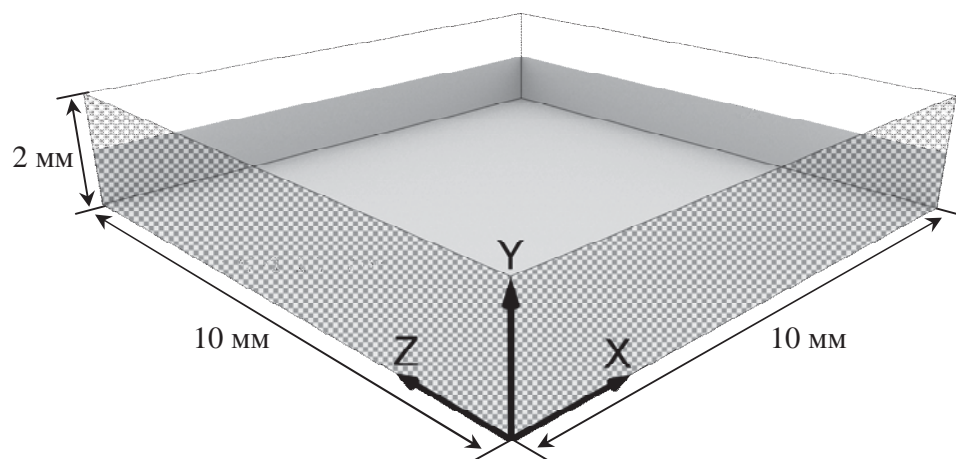


Рисунок 2.15. Обчислювальний домен та координатна система, що застосовувалася при розрахунках.

Початкові значення для полів H , $p - \rho gh$, \vec{U} і T були задані по всьому об'єму як 0 Дж, 0 Па, 0 м/с і 40 °С, відповідно.

Таблиця 2.1.

Граничні умови для величин, що застосовувалися при моделюванні випаровування. ∇_N^r позначає градієнт у нормальному до ділянки напрямку. Значення кута змочування було взято з [140], температура відповідала експериментальним значенням [1, 2], а решта граничних умов була вибрана відповідно до загальноприйнятих практик [141].

Величина	Ділянка "кювета"	Ділянка "повітря"	Ділянки XY і YZ
Об'єм рідини q	Кут змочування = $36,7^\circ$	Назовні: $\nabla_N^r q = 0$; всередину: $q = 0$	Площини симетрії
Ентальпія H	$\nabla_N^r H = 0$	$\nabla_N^r H = 0$	Площини симетрії
Різниця між статичним та гідравлічним тиском $p - \rho gh$	$\nabla_N^r (p - \rho gh) = 0$	$(p - \rho gh) = 0$	Площини симетрії
Швидкість U	$U = (0, 0, 0)$	$\nabla_N^r U = 0$	Площини симетрії
Температура T	$T = 40^\circ \text{C}$	$T = 40^\circ \text{C}$	Площини симетрії

У наших експериментах було виявлено, що після $t_{exp} = 20$ хвилин перебування у сушильній камері з кювети випаровується $0,060 \pm 0,003$ г розчину, а після $t_{exp} = 80$ хвилин – $0,224 \pm 0,003$ г. Відповідно, час висушування 0,5 мл розчину в середньому складає 3 години.

У зв'язку з тим, що обчислення займає багато часу, було вирішено починати моделювання з об'ємом води 0,333 мл (що відповідає $t_{exp} = 1$ год.). Якщо припускати, що характер течії всередині рідини залишається однаковим впродовж більшості часу висушування, це не повинно суттєво впливати на остаточний розподіл частинок. Для врахування меніска рідини,

який утворюється біля стінок кювети внаслідок поверхневого натягу, поле q було ініціалізовано за формулою (2.17)

$$q(x, y, z) = \min(\max((h(x, z) - y) / L_E + 0.5, 0), 1), \quad (2.17)$$

$$h(x, z) = h_C - (h_C - h_W) \cdot \min((w_{C/2} - \max(|x|, |z|)) / w_M, 1)^P,$$

де $L_E = 0,1$ мм – розмір скінченного елемента, $h_C = 1$ мм – висота стінок кювети, $w_{C/2} = 10$ мм – півширина кювети; решта параметрів були вибрані емпірично для наближення поверхні 0,333 мл рідини: $h_W = 0,75$ мм (висота рідини в центрі клітини), $w_M = 3,5$ мм (ширина меніска), $P = 1/3$ (емпіричний коефіцієнт, що визначає форму меніска). Функції $\min()$ та $\max()$ позначають мінімум і максимум набору значень, відповідно.

Моделювання виконувалося у наближенні нестискаємої Ньютонівської рідини і ламінарних течій, з використанням моделі поверхневого натягу Брекбріла [142] та моделі фазового переходу "Interface Equilibrium – No Dilatation" [138]. Властивості рідкої та газоподібної фаз, які застосовувалися при обчисленнях, наведені у табл. 2.2.

Таблиця 2.2.

Фізичні властивості води та пари при 40 °С.

Кінематична в'язкість води, м ² /с	0,658·10 ⁻⁶	[143]
Густина води, кг/м ³	992	[143]
Теплопровідність води, Вт/(м·К)	0,631	[143]
Питома теплоємність води, Дж/(кг·К)	4178	[143]
Кінематична в'язкість пари, м ² /с	20,5·10 ⁻⁶	[143]
Густина пари, кг/м ³	0,598	[143]
Теплопровідність пари, Вт/(м·К)	0,025	[143]
Питома теплоємність пари, Дж/(кг·К)	2077	[143]
Поверхневий натяг, кг/с ²	0,0695	[144]
Ентальпія фазового переходу, Дж/кг	2264705	[145]

Оскільки в `interThermalPhaseChangeFoam` [138, 139] напрямок фазового переходу (тобто режим випаровування чи конденсації) визначається різницею між температурою скінченного елемента T і температурою насичення рідини T_{sat} , довелося встановити температуру насичення нижчу, ніж температура кювети ($T_{\text{sat}} = 10^\circ\text{C}$ для скорочення часу обчислень) і використовувати модель, яка не включала утворення бульбашок пари. Внаслідок цього, при моделюванні швидкість випаровування була на 2–3 порядки вищою за експериментальну, але якісний характер отриманих течій можна у першому наближенні застосувати для оцінки розподілу компонентів розчину. Щоб співвіднести результати обчислень з експериментом, кожному моменту часу моделювання t_{sim} ставився у відповідність "експериментальний час" t_{exp} , що розраховувався, виходячи з об'єму води у кюветі (2.18):

$$t_{\text{exp}} = t_{\text{total}} \left(1 - \frac{4V_E}{V_0} \sum_{i,j,k} q(i,j,k) \right), \quad (2.18)$$

де загальна тривалість сушки $t_{\text{total}} = 10800$ с, об'єм скінченного елемента $V_E = 10^{-12} \text{ м}^3$, початковий об'єм розчину $V_0 = 5 \cdot 10^{-7} \text{ м}^3$, (i, j, k) – тривимірний індекс відповідного скінченного елемента. При моделюванні перерозподілу часток значення швидкостей \vec{U} також масштабувалися відповідним чином.

2.6.1.1. Аналіз динаміки випаровування

Динаміка висихання рідини, отримана в результаті чисельного моделювання, наведена на рис. 2.16–2.19. Доки поверхня рідини не досягла дна кювети, конвективні потоки в розчині мають характер, проілюстрований на рис. 2.16: має місце діагональна течія від кута до центра кювети, а також циркуляція між діагоналлю та стінками кювети (дещо відхилена в сторону кута кювети).

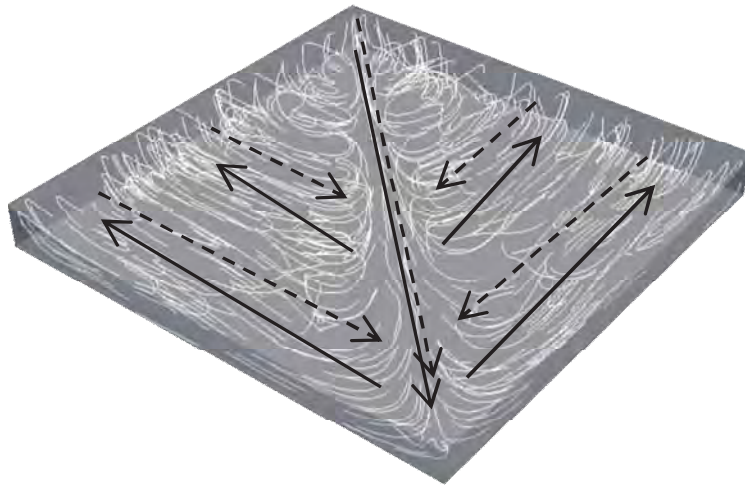


Рисунок 2.16. Напрями течій у час $t_{\text{exp}} = 1$ год. 13 хв. Суцільні стрілки позначають течії вздовж дна кювети, а пунктирні стрілки – вздовж поверхні рідини.

З ходом випаровування характер течій стає більш хаотичним (рис. 2.17 а), але в цілому цей режим зберігається майже до $2/3$ всього часу сушки (рис. 2.17 б).

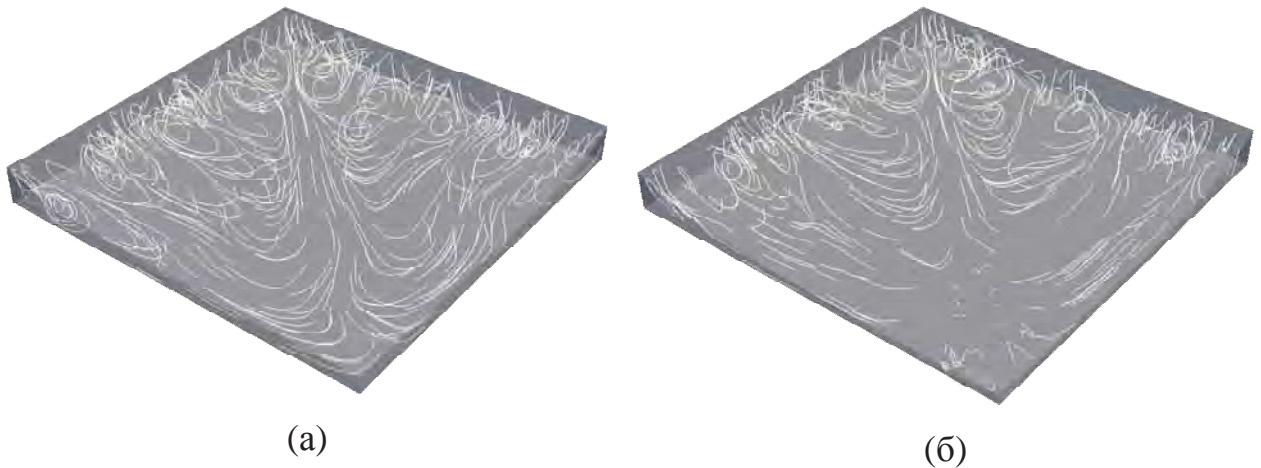
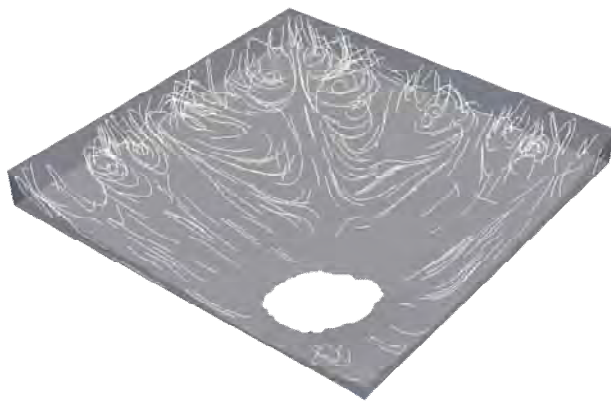
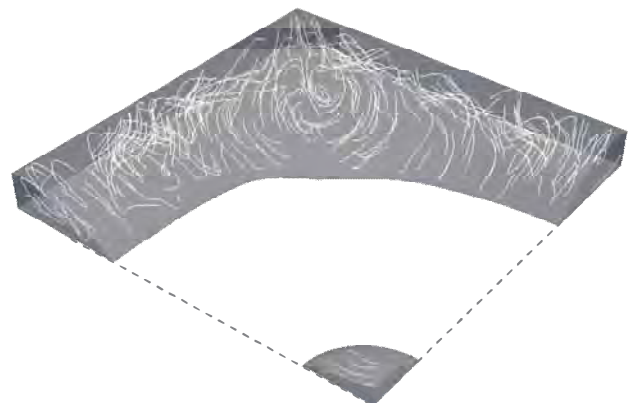


Рисунок 2.17. Течії у час (а) $t_{\text{exp}} = 1$ год. 36 хв, (б) $t_{\text{exp}} = 1$ год. 53 хв.

Коли поверхня рідини у певній точці кювети сягає дна (рис. 2.18 а), основна частина рідини за рахунок поверхневого натягу швидко відступає до стінок кювети, хоча невелика решта рідини може залишатися в центрі кювети (рис. 2.18 б).



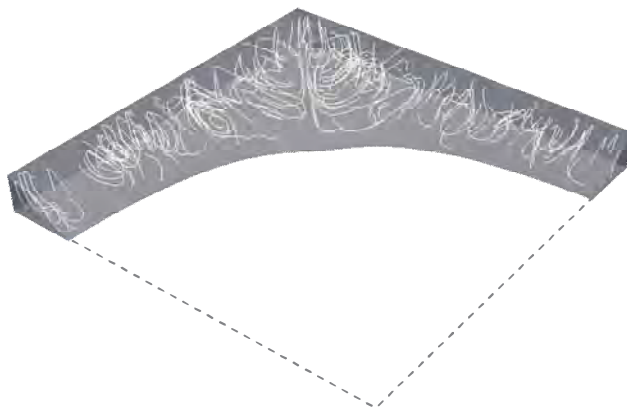
(а)



(б)

Рисунок 2.18. Формування "отвору" у поверхні рідини (а) $t_{\text{exp}} = 1$ год. 54 хв; центральна частина кювети залишилася без рідини, за винятком краплі посередині (б) $t_{\text{exp}} = 1$ год. 56 хв.

Після цього течії стабілізуються, утворюючи циркуляцію між дном, стінками та поверхнею рідини (рис. 2.19 а), і залишок часу рідина висихає до стінок кювети (рис. 2.19 б).



(а)



(б)

Рисунок 2.19. Течії та профіль рідини у час (а) $t_{\text{exp}} = 2$ год. 19 хв, (б) $t_{\text{exp}} = 2$ год. 42 хв.

2.6.2. Моделювання перерозподілу частинок БСА, Na^+ і Cl^-

Для моделювання перерозподілу частинок у розчині був застосований метод зміщеного випадкового блукання (biased random walk) на дискретній декартовій решітці (з кубічними елементами), де вірогідність переміщення

частинок між сусідніми клітинами решітки залежить від вектору швидкості рідини. За розмір дискретної решітки було взято ту ж саму кількість елементів (100x20x100). Концентрації БСА, Na^+ і Cl^- були ініціалізовані як рівномірно розподілені по об'єму рідини; оскільки характер течій всередині рідини між $t_{\text{exp}} = 1$ год. і $t_{\text{exp}} = 1$ год. 53 хв. практично не змінюється, початковий розподіл концентрацій не повинен суттєво впливати на остаточний розподіл частинок.

В основу алгоритму моделювання руху часток було покладено ідеї, описані в роботах [146, 147]. Загальна структура алгоритму зображена на рис. 2.20.

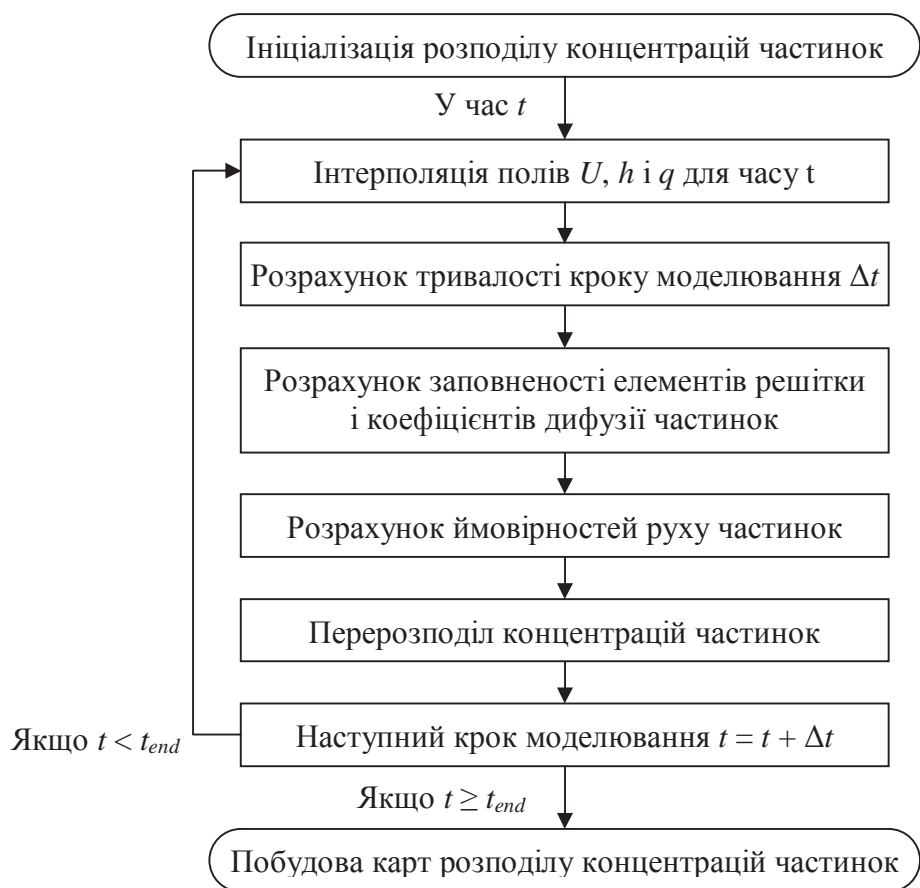


Рисунок 2.20. Блок-схема алгоритму моделювання перерозподілу частинок.

Під час моделювання молекули БСА та іони розчиненої солі (Na^+ , Cl^-) вважалися окремими типами частинок. Початкові концентрації та фізичні параметри цих частинок наведені у табл. 2.3.

Таблиця 2.3.

Параметри частинок, які використовувалися при розрахунках. Для БСА, r_p було узято з [148], V_p з [149], m_p з [150]. Для Na^+ і Cl^- , r_p було узято з [151], V_p було розраховано як об'єм сфер Ван дер Ваальсівського радіусу [152] та m_p було взято з [153].

Величина	БСА	Na^+	Cl^-
Концентрація C_0 , моль/м ³	$7,5 \cdot 10^{-3}$	20	20
Радіус Стокса r_p , м	$4 \cdot 10^{-9}$	$1,84 \cdot 10^{-10}$	$1,21 \cdot 10^{-10}$
Об'єм V_p , м ³	$8,09 \cdot 10^{-26}$	$4,90 \cdot 10^{-29}$	$2,24 \cdot 10^{-29}$
Маса m_p , кг	$1,10 \cdot 10^{-22}$	$3,82 \cdot 10^{-26}$	$5,89 \cdot 10^{-26}$

2.6.2.1. Інтерполяція полів U , h і q для часу t

Поля швидкостей U_t та кількості рідини q_t в певний момент часу t отримувалися шляхом лінійної інтерполяції знімків (2.19–2.21), які зберігалися з регулярним інтервалом при моделюванні випаровування рідини. Оскільки за інтервал часу між знімками поверхня розділу фаз може зміститися на більш ніж один елемент решітки, інтерполяція поля q не виконувалася безпосередньо. Натомість, кожному знімку q_n ставилася у відповідність карта висот h_n (що відповідає профілю розділу фаз), і поле q_t у момент часу t розраховувалося з інтерпольованої карти висот h_t (2.21):

$$\overset{!}{U}_t(x, y, z) = (1 - \tau) \cdot \overset{!}{U}_n(x, y, z) + \tau \cdot \overset{!}{U}_{n+1}(x, y, z), \quad (2.19)$$

$$h_t(x, z) = (1 - \tau) \cdot h_n(x, z) + \tau \cdot h_{n+1}(x, z), \quad (2.20)$$

$$q_t(x, y, z) = \min(\max((h_t(x, z) - y) / L_E + 0.5, 0), 1), \quad (2.21)$$

де $\overset{!}{U}_n$, h_n – знімки поля швидкостей і карти висот у момент часу t_n , коефіцієнт інтерполяції $\tau = (t - t_n) / (t_{n+1} - t_n)$, розмір скінченного елемента $L_E = 0,1$ мм.

2.6.2.2. Розрахунок тривалості кроку моделювання Δt

Для забезпечення коректності розрахунків, тривалість кроку моделювання Δt повинна бути такою, щоб за цей відрізок часу будь-яка частинка могла пройти шлях, не більший за лінійний розмір елемента решітки L_E :

$$\Delta t \cdot U_{\max} < L_E, \quad (2.22)$$

де U_{\max} – максимальна проекція швидкості у даному кроці моделювання

$$\begin{aligned} U_{\max}(i, j, k) &= \max(|U_x(i, j, k)|, |U_y(i, j, k)|, |U_z(i, j, k)|), \\ U_{\max} &= \max(U_{\max}(i, j, k) : i = 1, \dots, N_i; j = 1, \dots, N_j; k = 1, \dots, N_k). \end{aligned} \quad (2.23)$$

У даному випадку за максимальну дистанцію, яку частинка може пройти за один крок моделювання, було вирішено взяти $1/3$ від розміру елемента решітки (як компроміс між точністю моделювання і часом, витраченим на обчислення):

$$\Delta t = \frac{1}{3} \frac{L_E}{U_{\max}}. \quad (2.24)$$

2.6.2.3. Розрахунок заповненості елементів решітки і коефіцієнтів дифузії частинок

Кожний елемент просторової решітки може містити колоїдні частинки (БСА) та іони розчиненої солі (Na^+ , Cl^-). На відміну від робіт [146, 147], кількість частинок у даному випадку занадто велика, щоб їх можна було моделювати окремо. В зв'язку з цим моделювався не рух частинок безпосередньо, а перерозподіл їхньої кількості речовини між сусідніми елементами решітки.

Якщо вважати колоїдні та розчинені частинки твердими сферами, то їхня загальна кількість у елементі решітки обмежується умовою

$$\phi_{total}(i, j, k) < \phi_{max}, \quad (2.25)$$

де $\phi_{total}(i, j, k)$ – сумарна об'ємна частка в елементі решітки (i, j, k) , ϕ_{max} – максимальна фракція упаковки. При наближенні ϕ_{total} до ϕ_{max} щільність упаковки частинок стає такою, що їхній рух фактично унеможлиблюється.

Сумарна об'ємна частка є сумою об'ємних часток $\phi_p(i, j, k)$ кожного типу частинки p

$$\phi_{total}(i, j, k) = \sum_p \phi_p(i, j, k). \quad (2.26)$$

$\phi_p(i, j, k)$, у свою чергу, розраховується як

$$\phi_p(i, j, k) = n_p(i, j, k) \cdot N_A \cdot V_p / V_E, \quad (2.27)$$

де $n_p(i, j, k)$ – кількість речовини частинок типу p у відповідному елементі решітки, N_A – число Авогадро, V_p – об'єм частинки цього типу, V_E – об'єм елемента решітки.

Значення ϕ_{max} визначається геометрією упаковки, яка залежить від форми і розподілу частинок, але не від розміру частинок. Для твердих сфер теоретичним значенням зазвичай вважається $\phi_{max} = 0,64$ [154], що відповідає випадковій тісній упаковці. Проте, згідно з експериментальними дослідженнями дисперсій твердих сфер [155, 156], молекулярна рухливість зникає при досягненні значення об'ємної частки, що відповідає переходу колоїдного скла ϕ_g [155, 156]. Для монодисперсних твердих сфер $\phi_g = 0,58$ [157, 158].

Наша система є полідисперсною (частинки BSA, Na^+ і Cl^- мають різний розмір), тому ϕ_{max} кожного елемента решітки буде залежати від його вмісту.

Оскільки формула для оцінки ϕ_{max} в опублікованій літературі існує лише для бідисперсних систем [159], в даному випадку її можна застосувати, якщо вважати різницю розмірів Na^+ і Cl^- нехтовно малою (порівняно з БСА):

$$\phi_{max} = \min \left(\frac{\phi_{max\ mono}}{1 - w \cdot (1 - \phi_{max\ mono})}, \frac{\phi_{max\ mono}}{w} \right), \quad (2.28)$$

$$w = \phi_{large} / (\phi_{large} + \phi_{small}), \quad (2.29)$$

де $\phi_{max\ mono}$ – максимальна фракція упаковки монодисперсної системи (ϕ_g в даному випадку), ϕ_{large} – об'ємна частка великих частинок (БСА), ϕ_{small} – об'ємна частка маленьких частинок (у даному контексті різниця в розмірах Na^+ і Cl^- вважається нехтовно малою).

Ступінь рухливості частинок в елементі решітки (i, j, k) можна охарактеризувати величиною

$$\Phi(i, j, k) = 1 - \frac{\phi_{total}(i, j, k)}{\phi_{max}}. \quad (2.30)$$

Ця величина модулює кількість частинок, які можуть перейти між елементами решітки за крок моделювання, а також використовується для розрахунку локальної в'язкості дисперсії за напівемпіричною формулою Крігера і Догерті [160]:

$$\mu(i, j, k) = \mu_F \cdot \left(1 - \frac{\phi_{total}(i, j, k)}{\phi_{max}} \right)^{-\phi_{max}}, \quad (2.31)$$

де μ_F – динамічна в'язкість рідини.

Окрім руху в результаті адвекції рідини, частинки також можуть переходити до сусідніх елементів решітки за рахунок дифузії. Коефіцієнт

дифузії D_p для сферичної частинки p можна оцінити за рівнянням Стокса-Ейнштейна:

$$D_p(i, j, k) = \frac{k_B T}{6\pi\mu(i, j, k)r_p}, \quad (2.32)$$

де k_B – стала Больцмана, T – температура, r_p – радіус Стокса частинки.

2.6.2.4. Розрахунок ймовірностей руху частинок

При моделюванні випадкового блукання на решітці, за один крок моделювання окрема частинка може з певною вірогідністю P переміститися в один з сусідніх елементів решітки або залишитися на місці (взаємовиключні події). У випадку великої кількості часток ці ймовірності можуть вважатися пропорційними кількості речовини Δn , що перемістилася в тому чи іншому напрямку:

$$\frac{\Delta n(i, j, k, \Delta i, \Delta j, \Delta k)}{n(i, j, k)} \approx P(i, j, k, \Delta i, \Delta j, \Delta k), \quad (2.33)$$

де $n(i, j, k)$ – кількість речовини у елементі решітки з тривимірним індексом (i, j, k) , а $\Delta i, \Delta j, \Delta k \in \{-1, 0, 1\}$ позначає напрямок переміщення частинок.

Зміщене випадкове блукання передбачає, що вірогідність переміщення вздовж напрямку течії має бути більше вірогідності переміщення у протилежному напрямку. Для розрахунку ймовірностей руху частинок між елементами решітки було розглянуто три методи.

Розрахунок ймовірностей руху частинок: метод 1

Перший метод був описаний у роботі [147], де вірогідності переходів часток залежали тільки від поля швидкості:

$$P_{\pm x} = \frac{1}{2N} \left(1 \pm \frac{U_x}{U_{\max}} \right), \quad P_{\pm y} = \frac{1}{2N} \left(1 \pm \frac{U_y}{U_{\max}} \right), \quad P_{\pm z} = \frac{1}{2N} \left(1 \pm \frac{U_z}{U_{\max}} \right), \quad (2.34)$$

$$P_w = 1 - (P_{-x} + P_{+x} + P_{-y} + P_{+y} + P_{-z} + P_{+z}),$$

де P_{-x} , P_{+x} , P_{-y} , P_{+y} , P_{-z} , P_{+z} – ймовірності руху у напрямку відповідних осей системи координат, P_w – ймовірність частинки залишитися на місці, $N = 3$ – розмірність простору, U_x , U_y , U_z – компоненти вектора поля швидкості у даній точці, U_{\max} – максимальна проекція швидкості у даному кроці моделювання.

Для врахування тривалості кроку моделювання, вірогідності переходів обчислювалися таким чином:

$$P_{\pm x} = \left(\frac{\Delta t \cdot |U_x(i, j, k)|}{L_E} \right) \cdot \left(\frac{1 \pm U_x(i, j, k)/U_{\max}}{6} \right),$$

$$P_{\pm y} = \left(\frac{\Delta t \cdot |U_y(i, j, k)|}{L_E} \right) \cdot \left(\frac{1 \pm U_y(i, j, k)/U_{\max}}{6} \right),$$

$$P_{\pm z} = \left(\frac{\Delta t \cdot |U_z(i, j, k)|}{L_E} \right) \cdot \left(\frac{1 \pm U_z(i, j, k)/U_{\max}}{6} \right), \quad (2.35)$$

$$P_{\text{sum}} = P_{-x} + P_{+x} + P_{-y} + P_{+y} + P_{-z} + P_{+z},$$

$$P(i, j, k, \pm 1, 0, 0) = P_{\pm x} / \max(P_{\text{sum}}, 1),$$

$$P(i, j, k, 0, \pm 1, 0) = P_{\pm y} / \max(P_{\text{sum}}, 1),$$

$$P(i, j, k, 0, 0, \pm 1) = P_{\pm z} / \max(P_{\text{sum}}, 1),$$

$$P(i, j, k, 0, 0, 0) = 1 - \min(P_{\text{sum}}, 1),$$

де Δt – тривалість кроку моделювання, L_E – розмір елемента решітки.

Розрахунок ймовірностей руху частинок: метод 2

Ідею другого методу було взято з роботи [146], згідно з якою вірогідність переходів часток між елементами решітки пропорційна до розподілу Больцмана:

$$P_S \propto \exp(-E_S / k_B T), \quad (2.36)$$

де P_S – ймовірність знайти частинку у стані S , E_S – енергія стану S , k_B – стала Больцмана, T – температура, $\exp()$ – експоненційна функція.

У даному випадку E_S відповідає роботі, яку частинка повинна виконати для протидії силі Стокса, щоб переміститися на певну відстань у заданому напрямку:

$$E_S(\vec{r}) = -6\pi\mu r_p(\vec{U} \cdot \vec{r}), \quad (2.37)$$

де \vec{U} – вектор швидкості рідини у даній точці, \vec{r} – вектор напрямку, у якому очікується переміщення частинки за крок моделювання Δt

$$\vec{r} = \overrightarrow{\Delta ijk} \cdot (\Delta t \cdot |\vec{U}|), \quad (2.38)$$

де $\overrightarrow{\Delta ijk}$ – одиничний вектор напрямку до сусіднього елемента решітки (або нульовий вектор у випадку, якщо частинка залишиться на місці).

Об'єднавши рівняння (2.36–2.38), отримаємо

$$\begin{aligned} P_{\pm x} &= C \cdot \exp\left(\pm \frac{6\pi\mu r_p \cdot U_x \cdot (\Delta t \cdot |U_x|)}{k_B T}\right) = C \cdot \exp\left(\pm \frac{U_x \cdot (\Delta t \cdot |U_x|)}{D_p}\right), \\ P_{\pm y} &= C \cdot \exp\left(\pm \frac{6\pi\mu r_p \cdot U_y \cdot (\Delta t \cdot |U_y|)}{k_B T}\right) = C \cdot \exp\left(\pm \frac{U_y \cdot (\Delta t \cdot |U_y|)}{D_p}\right), \\ P_{\pm z} &= C \cdot \exp\left(\pm \frac{6\pi\mu r_p \cdot U_z \cdot (\Delta t \cdot |U_z|)}{k_B T}\right) = C \cdot \exp\left(\pm \frac{U_z \cdot (\Delta t \cdot |U_z|)}{D_p}\right), \\ P_w &= C \cdot \exp\left(\frac{6\pi\mu r_p \cdot \vec{U} \cdot \vec{0}}{k_B T}\right) = C \cdot 1. \end{aligned} \quad (2.39)$$

де $P_{-x}, P_{+x}, P_{-y}, P_{+y}, P_{-z}, P_{+z}$ – ймовірності руху у напрямку відповідних осей системи координат, P_w – ймовірність частинки залишитися на місці, U_x, U_y, U_z – компоненти вектора поля швидкості у даному елементі, D_p – коефіцієнт дифузії у даному елементі, C – довільна константа. Відповідно,

$$\begin{aligned}
 P_{sum} &= P_{-x} + P_{+x} + P_{-y} + P_{+y} + P_{-z} + P_{+z} + P_w, \\
 P(i, j, k, \pm 1, 0, 0) &= P_{\pm x} / P_{sum}, \\
 P(i, j, k, 0, \pm 1, 0) &= P_{\pm y} / P_{sum}, \\
 P(i, j, k, 0, 0, \pm 1) &= P_{\pm z} / P_{sum}, \\
 P(i, j, k, 0, 0, 0) &= P_w / P_{sum}.
 \end{aligned}
 \tag{2.40}$$

Розрахунок ймовірностей руху частинок: метод 3

Як третій метод розрахунку ймовірностей було використано спрощену геометричну інтерпретацію руху частинок (рис. 2.21).

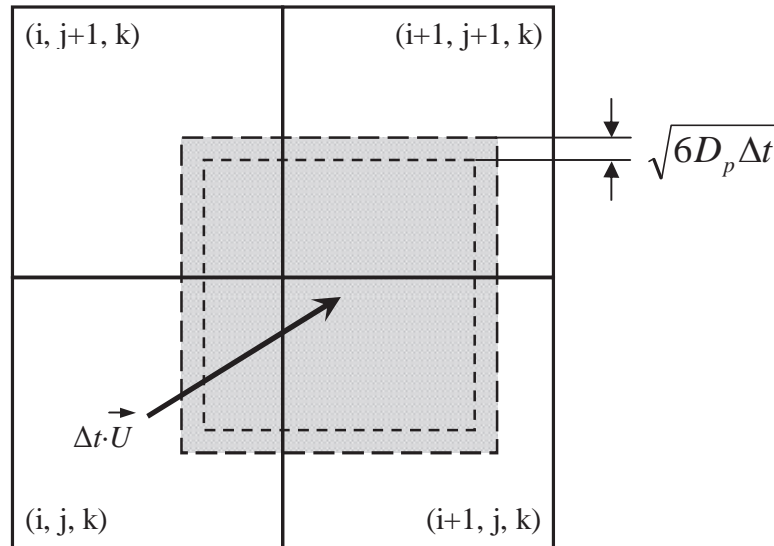


Рисунок 2.21. Схематична ілюстрація руху частинок у третьому методі розрахунку.

Якщо припустити, що у час t частинки рівномірно заповнюють об'єм $V_E = L_E^3$ елемента (i, j, k) та їхній рух за крок моделювання Δt складається з паралельного переносу вздовж вектора швидкості рідини $(\Delta t \cdot \vec{U})$ і броунівського руху у випадковому напрямку (на відстань середньоквадратичного зміщення $\sqrt{6D_p \Delta t}$), то у момент $t + \Delta t$ ці частинки будуть приблизно займати кубічний об'єм V'

$$V' \approx (L_E + 2\sqrt{6D_p \Delta t})^3, \quad (2.41)$$

який буде частково перетинатися з декількома елементами решітки.

Відповідно, ймовірність частинок залишитися у елементі (i, j, k) або переміститися до сусіднього елемента решітки буде пропорційна об'єму перетину куба V' з об'ємом відповідного кубічного елемента:

$$\begin{aligned} B_{\pm x} &= \max(L_E \cdot (\Delta i \pm 0.5), \Delta t \cdot U_x \pm \sqrt{6D_p \Delta t}), \\ B_{\pm y} &= \max(L_E \cdot (\Delta j \pm 0.5), \Delta t \cdot U_y \pm \sqrt{6D_p \Delta t}), \\ B_{\pm z} &= \max(L_E \cdot (\Delta k \pm 0.5), \Delta t \cdot U_z \pm \sqrt{6D_p \Delta t}), \\ L_x &= \max(B_{+x} - B_{-x}, 0), \\ L_y &= \max(B_{+y} - B_{-y}, 0), \\ L_z &= \max(B_{+z} - B_{-z}, 0), \\ P(i, j, k, \Delta i, \Delta j, \Delta k) &= \frac{L_x \cdot L_y \cdot L_z}{V'}. \end{aligned} \quad (2.42)$$

2.6.2.5. Додаткові правила розрахунку ймовірностей та перерозподілу концентрацій

Окрім наведених вище методів розрахунку ймовірностей, при моделюванні перерозподілу частинок також застосовувалися такі додаткові правила.

У випадку, коли у елементі відсутня вода ($q(i, j, k) = 0$), усі частинки цього елемента можуть рухатися або вертикально вниз ($P(i, j, k, \Delta i, \Delta j, \Delta k) = 100\%$ для $\Delta i = 0, \Delta j = -1, \Delta k = 0$), або залишатися на місці (якщо $j = 0$). Це імітує дію гравітації та перешкоджає руху частинок на повністю висушених ділянках кювети.

На границях обчислювального домену рух частинок обмежується відповідними граничними умовами ($P(i, j, k, \Delta i, \Delta j, \Delta k) = 0$ у напрямку стінок і дна кювети та дзеркально перерозподіляється біля площин симетрії). Інші типи взаємодій (наприклад, прилипання частинок до поверхні кювети) в даному випадку не моделювалися.

Оскільки частинки не можуть виходити за межі рідини та повинні з меншою вірогідністю пересуватися у елементи решітки з високим ступенем упаковки частинок, рух у напрямку сусідніх елементів додатково обмежувався таким чином:

$$P(i, j, k, \Delta x, \Delta y, \Delta z) = \Phi(i + \Delta i, j + \Delta j, k + \Delta k) \times \min(P(i, j, k, \Delta x, \Delta y, \Delta z), q(i + \Delta i, j + \Delta j, k + \Delta k))', \quad (2.43)$$

де q – кількість рідини у елементі, Φ – ступінь рухливості (2.30).

Після застосування цих правил сума вірогідностей може бути вже менше одиниці, тому ймовірність частинок залишитися у елементі (i, j, k) перераховується як

$$P(i, j, k, 0, 0, 0) = 1 - \sum_{\Delta x} \sum_{\Delta y} \sum_{\Delta z} P(i, j, k, \Delta x, \Delta y, \Delta z). \quad (2.44)$$

За відсутності зовнішнього електричного поля, концентрації іонів Na^+ і Cl^- , усереднені по об'єму кубічного елемента решітки, можна вважати завжди однаковими, тому під час моделювання перерозподіл частинок Na^+ і Cl^- між елементами решітки відбувався синхронізовано.

Щоб запобігти накопиченню помилок округлення, в кінці кожного кроку моделювання кількості БСА, Na^+ і Cl^- у елементах решітки нормувалися для підтримання сумарної кількості відповідних частинок.

2.6.3. Аналіз результатів моделювання

Розподіл концентрацій білка і солі для першого методу розрахунку вірогідностей наведено на рис. 2.22 (а, б) відповідно. Оскільки ймовірності переходів частинок у цьому методі залежать тільки від поля швидкості рідини, отримані розподіли БСА і NaCl між собою не відрізняються. На відстані < 1 мм від країв кювети спостерігається підвищена концентрація частинок, на відстані 1–3 мм від країв кювети (межа, до якої відходить розчин після утворення "отвору" у поверхні рідини) розподіл дещо менший та нерівномірний, на відстані 3–7 мм (центральна частина, яка швидко втратила всю рідину) розподіл рівномірний, і по діагоналі спостерігається смуга дещо заниженої концентрації, що відбиває характер течій біля діагоналі.

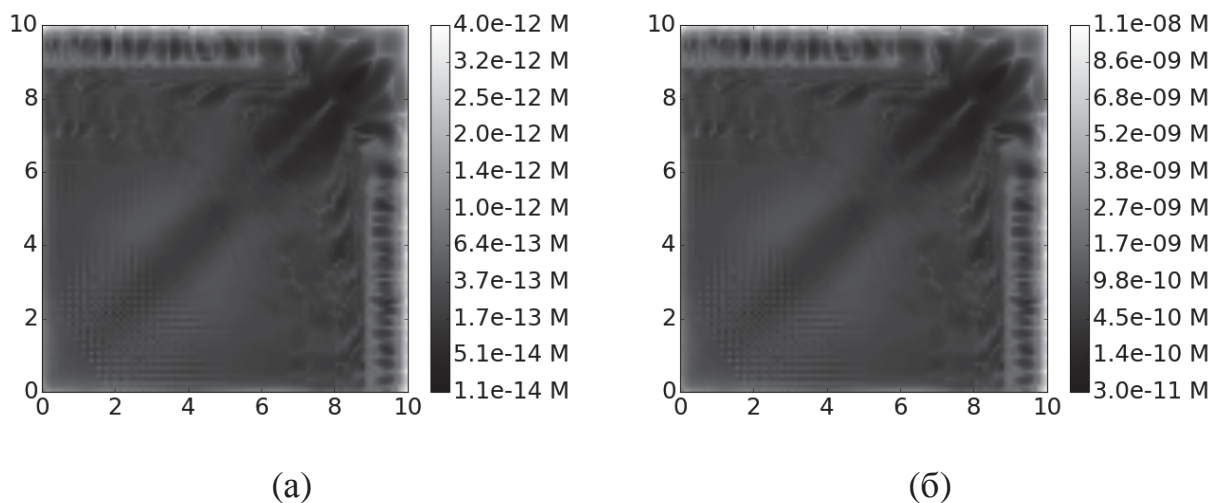


Рисунок 2.22. Розподіл БСА (а) і NaCl (б) для 1-го методу розрахунку. Центр кювети у лівому нижньому куті зображень.

Другий (рис. 2.23) та третій (рис. 2.24) методи беруть до уваги ступінь дифузивності частинок, тому вони дають дещо різні та значно менш

рівномірні розподіли для білка та солі. За винятком низки точок на краях кювети з надмірною концентрацією частинок, в основному БСА і NaCl зосереджені у смузі, що розташована на відстані 1–3 мм від країв кювети та має форму закругленого квадрата. На відміну від білка (рис. 2.23 а, 2.24 а), сіль також рівномірно присутня у помітній кількості поза цією смугою (рис. 2.23 б, 2.24 б), що обумовлено більшою дифузивністю частинок NaCl.

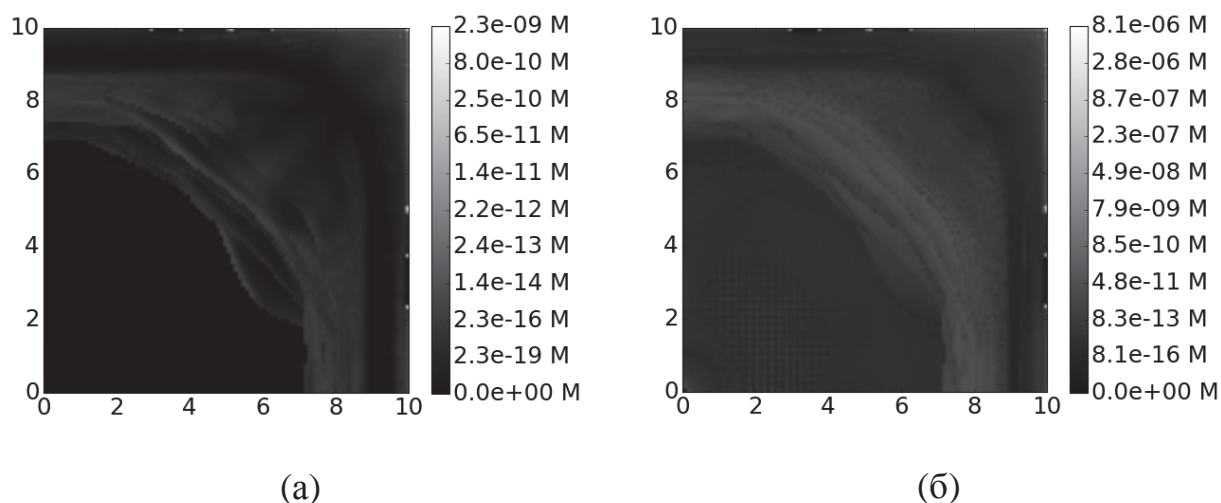


Рисунок 2.23. Розподіл БСА (а) і NaCl (б) для 2-го методу розрахунку. Центр кювети у лівому нижньому куті зображень.

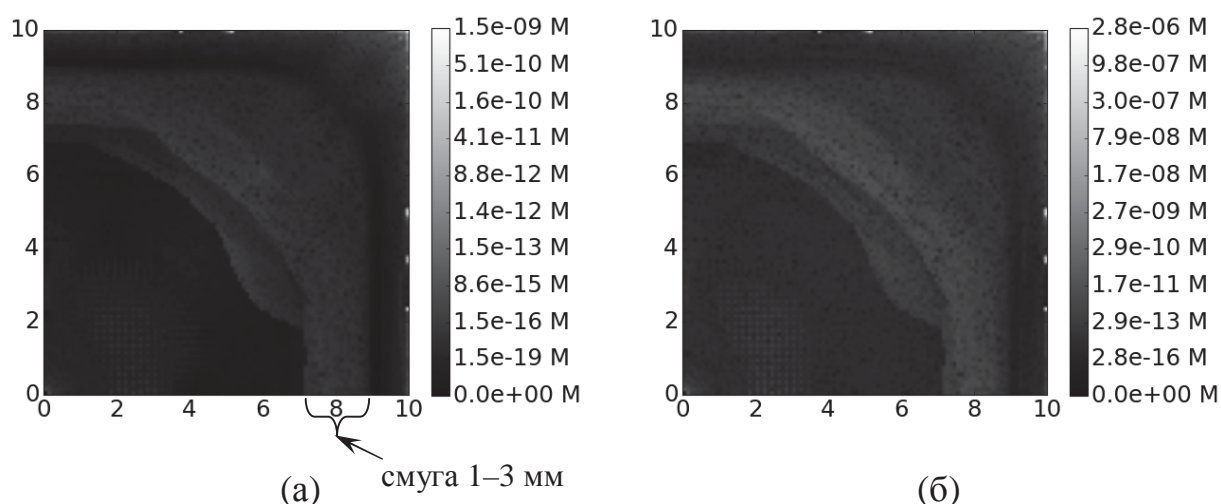


Рисунок 2.24. Розподіл БСА (а) і NaCl (б) для 3-го методу розрахунку. Центр кювети у лівому нижньому куті зображень.

Отримані результати свідчать про те, що недолік методу 1 (не враховує дифузійність частинок) суворіший, ніж недолік методу 2 (експоненційна залежність імовірності руху частинок від швидкості рідини). Оскільки метод 3 не має цих недоліків, можна очікувати, що отримані за його допомогою результати будуть найбільш точними серед трьох методів.

Нарешті, порівняння результатів моделювання з експериментальним розподілом текстур (рис. 2.25 а, б) та, зокрема, Z-патернів (рис. 2.26 а) на плівках дає змогу зробити такі спостереження:

1. Текстури припиняють формуватися на відстані 1–1,5 мм від країв кювети, що приблизно відповідає межі смуги 1–3 мм на рис. 2.23 та рис. 2.24. Оскільки чисті сольові розчини (без біополімеру) не утворюють текстур [1], результати моделювання дозволяють припустити, що дуже низька концентрація БСА між смугою 1-3 мм та стінками кювети є імовірною причиною того, чому текстури не займають всю площу кювети.

2. Z-патерни зосереджені приблизно на тій же відстані від країв кювети, до якої відходить розчин під час моделювання після утворення "отвору" у поверхні рідини, а також практично відсутні у невеликій центральній частині кювети, яка приблизно співпадає з краплею рідини, що відокремилася від основної частини розчину після утворення "отвору" у ньому (рис. 2.26 б). Це свідчить на користь того, що швидке висушування є однією з основних умов для формування Z-патернів.

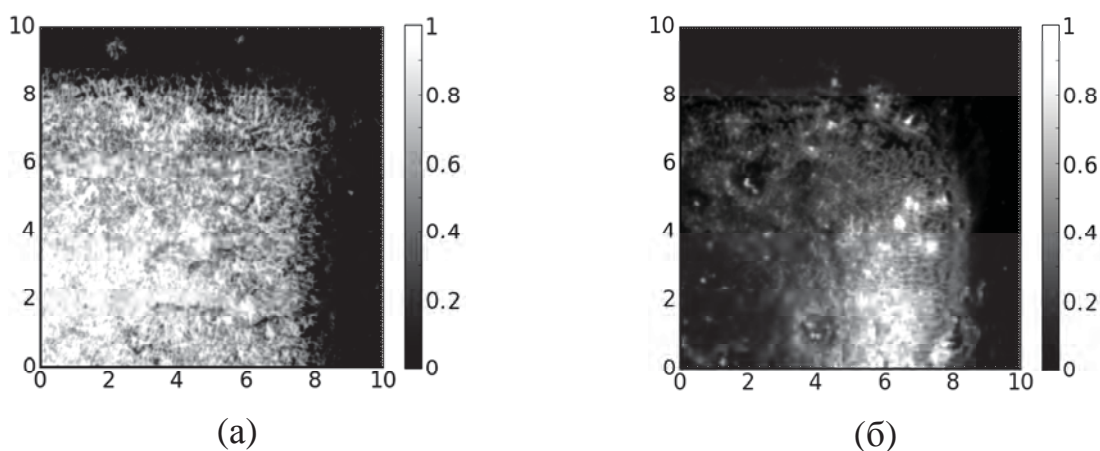


Рисунок 2.25. Розподіл щільності текстур на плівках БСА+NaCl (а) і САЧ+NaCl (б). Центр кювети у лівому нижньому куті зображень.

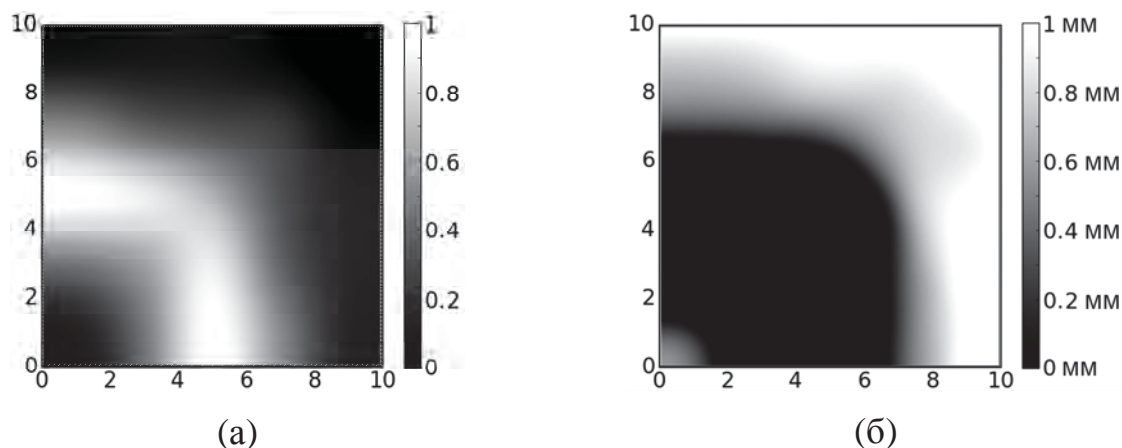


Рисунок 2.26. (а) Нормалізований інтерпольований розподіл щільності Z-патернів на плівках БСА+NaCl (результат симетричного усереднення по 19 плівкам); (б) карта висот поверхні рідини у час $t_{exp} = 1$ год. 56 хв. 35 с. Центр кювети у лівому нижньому куті зображень.

Таким чином, проведене моделювання висихання розчину БСА з NaCl в квадратній кюветі дозволило отримати розподіли концентрацій біополімеру та солі, які приблизно відповідають експериментальним розподілам щільності текстур на поверхні кювети. Отримані результати підтримують припущення про те, що площа текстур на плівці залежить від локальної концентрації біополімеру, а зигзагоподібні патерни формуються у ділянках з високою швидкістю висушування, згідно з розрахунками.

Висновки до розділу 2

1. Описано процедуру приготування плівок з водно-сольових розчинів біополімерів. Представлено структурну схему створеної установки для отримання плівок, що містить елементи контролю вологості та температури для підтримування стабільних умов для отримання плівок.

2. Описано методику отримання фотографічних зображень плівок біополімерів та методику сканування плівок з використанням оптичної мікроскопії та оцифрування зображень.

3. Розроблено методику аналізу впливу на біополімери по текстурам їхніх плівок, яка включає аналіз заповненості площі кювети текстурами, розрахунок фрактальних характеристик текстур плівок та розрахунок питомої довжини зигзагів. Виявлено додаткові показники для аналізу Z-структур (довжина сегментів зигзагів, кут між сегментами, кількість сегментів, параметри апроксимуючих функцій).

4. Визначено статистичну модель розподілу зигзагоподібних структур та виявлено найбільш інформативні характеристики Z-структур (кількість сегментів зигзагів та їхня середня довжина).

5. Проведено моделювання випаровування рідини в квадратній кюветі та моделювання перерозподілу частинок біополімеру та солі при висиханні плівки. Результати моделювання узгоджуються з експериментом.

З використанням розглянутих методів було вивчено ряд систем, що складаються з сольових розчинів біополімерів (ДНК або сироватковий альбумін) і неорганічних або органічних добавок, а також досліджено зміни характеристик текстур плівок при фізичних впливах (температура, гамма-опромінення) на розчин.

Результати досліджень даного розділу наведено в публікаціях здобувача: [7], [16].

РОЗДІЛ 3

ВПЛИВ КОМПОНЕНТІВ БУФЕРНИХ РОЗЧИНІВ (КАТІОНИ, АНІОНИ, ОРГАНІЧНІ СПОЛУКИ) НА ТЕКСТУРИ ПЛІВОК

Для підтримки фізіологічних значень рН, осмолярності та концентрацій іонів в біофізичних експериментах зазвичай використовуються буферні розчини таких речовин, як Трис і ЕДТО для ДНК [161, 162] та натрій-фосфатний буфер (основною складовою якого є NaCl) для білків і клітин [163]. Щоб оцінити, як вони впливають на формування текстур плівок біополімерів, було досліджено ефект присутності Трис і ЕДТО, а також заміни Na^+ або Cl^- на інші іони.

3.1 Вплив Трис і ЕДТО на текстури плівок ДНК

Плівки було отримано з розчинів солі Na-ДНК тимуса теляти з концентрацією 0,2 мг/мл в 10 мМ розчині NaCl (для того, щоб ДНК знаходилася в двоспиральному стані), з додаванням 10 мМ Трис і 1 мМ ЕДТО по окремості або разом [3]. Для стандартного буферного розчину (10 мМ Трис і 1 мМ ЕДТО) значення рН = 7,6.

Розчини висушувалися протягом 3,5 годин при відносній вологості (ВВ) = 40% і температурі (Т) = 40 °С. Після сушки плівки знаходилися у кімнатних умовах (ВВ = 60%, Т = 22 °С).

Розчини Na-ДНК + 10 мМ NaCl + 10 мМ Трис та Na-ДНК + 10 мМ NaCl + 1 мМ ЕДТО при висушуванні не призводять до формування будь-яких текстур на поверхні плівки.

На рис. 3.1 наведено фотографії плівки, отриманої з розчину Na-ДНК + 10 мМ NaCl + 10 мМ Трис + 1 мМ ЕДТО. Можна бачити, що відразу після висушування (рис. 3.1.а) на плівці відсутні будь-які текстури. Після витримання протягом 20 годин в кімнатних умовах (рис. 3.1.б) на поверхні плівки утворюються структури, що займають, в цілому, приблизно $3 \pm 1\%$ від площі кювети. Через 44 години після вилучення з сушильної камери (рис.

3.1.в) площа текстури збільшилася до $65 \pm 10\%$ від площі кювети. На рис. 3.1.г і рис. 3.1.д представлені фрагменти рисунків 3.1.б і 3.1.в у збільшеному в 2 рази масштабі. Подібні структури характерні для полімерних сферолітів, описаних у роботах [164, 165]. Подальша витримка плівки в тих же умовах не призводить до зміни текстури плівки.

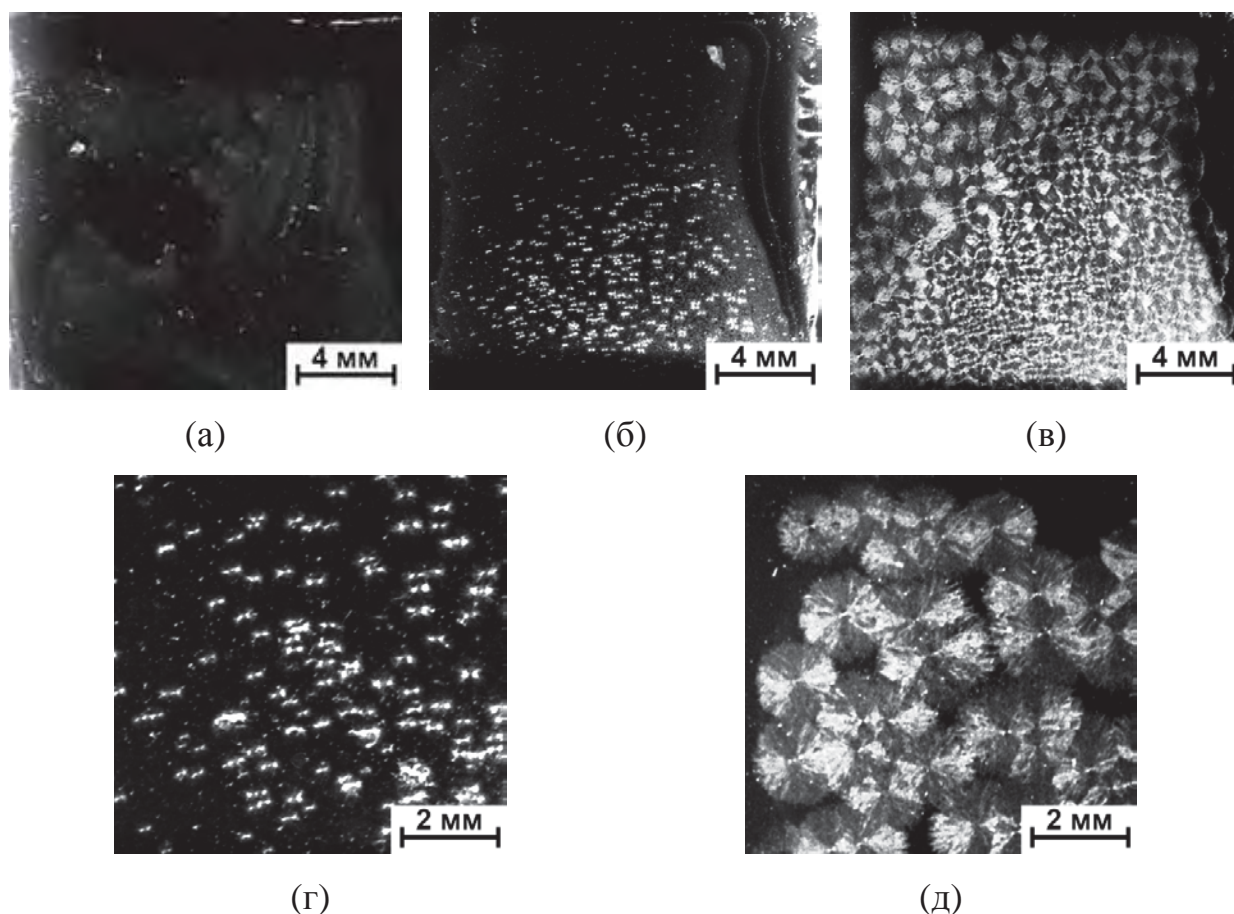


Рисунок 3.1. Фотографії плівки, отриманої з розчину Na-ДНК + 10 мМ NaCl + 10 мМ Трис + 1 мМ ЕДТО: (а) відразу після висушування; (б) через 20 год.; (в) через 44 год.; (г) збільшений фрагмент рис. 3.1.б; (д) збільшений фрагмент рис. 3.1.в.

Отримані результати свідчать про те, що Трис і ЕДТО пригнічують формування будь-яких текстур при висушуванні плівки. Текстури сферолітів, які з'являються через 1-2 дні після висушування розчину ДНК+NaCl+Трис+ЕДТО, ймовірно, пов'язані з неповною іммобілізацією ДНК, що призводить до повільної рекристалізації при кімнатних умовах.

3.2 Заміна Na^+ на інші лужні метали (K^+ , Rb^+)

При заміні NaCl на KCl і RbCl в розчинах ДНК [18] було визначено, що це не перешкоджає формуванню зигзагоподібних патернів, хоча площа текстур (S) та фрактальна розмірність (D) при цьому знижується (рис. 3.2, 3.3, 3.4). Як показано у роботі [166], це може бути пов'язано зі збільшенням маси іона та його розміру в ряду Na , K , Rb . У випадку білків (БСА, САЛ) заміна натрію на калій теж не перешкоджає формуванню зигзагоподібних патернів, і площа текстур та фрактальна розмірність фактично не змінюються (рис. 3.5, 3.6).

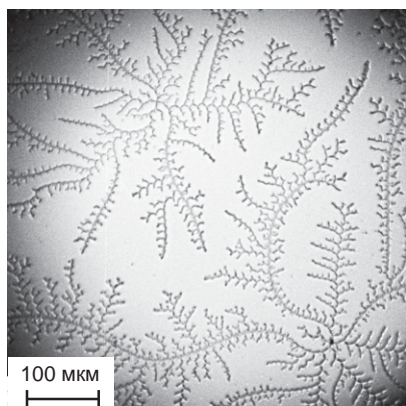


Рисунок 3.2. 0,2 мг/мл Na -ДНК, 10 мМ NaCl
 $D = 1,68$; $S = 53\%$

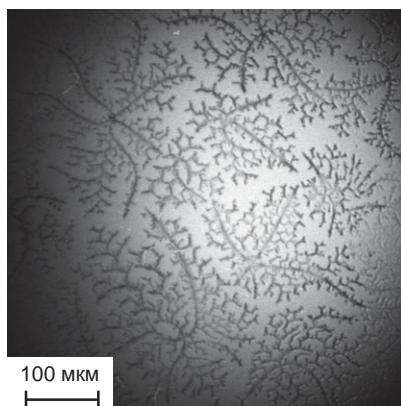


Рисунок 3.3. 0,2 мг/мл Na -ДНК, 10 мМ KCl
 $D = 1,52$; $S = 32\%$

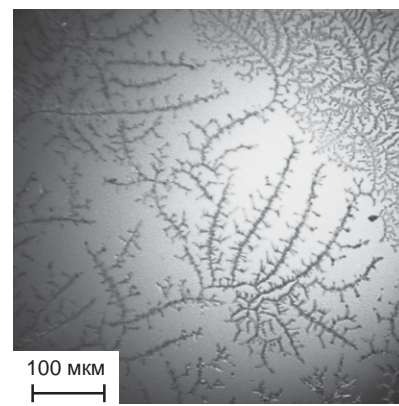


Рисунок 3.4. 0,2 мг/мл Na -ДНК, 10 мМ RbCl
 $D = 1,52$; $S = 14\%$

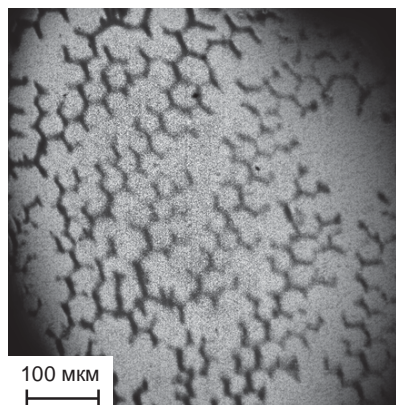


Рисунок 3.5. 0,5 мг/мл САЛ + 20 мМ KCl . $D = 1,85$; $S = 61\%$

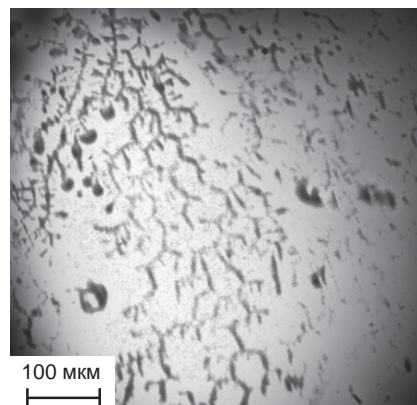
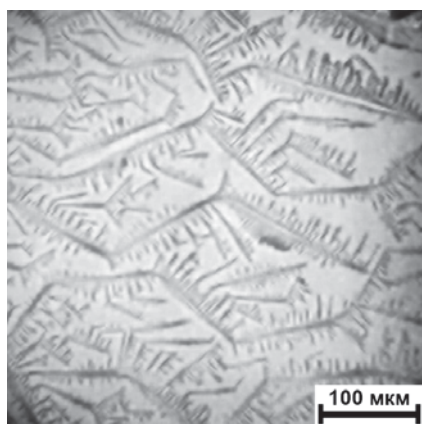


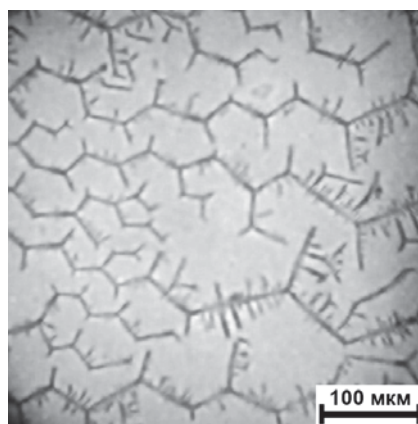
Рисунок 3.6. 0,5 мг/мл БСА + 20 мМ NaCl . $D = 1,83$; $S = 50\%$

3.3 Заміна Cl^- на інші галогенід-іони (F^- , Br^-)

Щоб оцінити вплив аніонів солі на формування Z-патернів, було досліджено розчини БСА з галогенідами натрію NaF, NaCl і NaBr [1, 8, 9]. Текстури відповідних плівок показані на рис. 3.7, 3.8, 3.9. Значення питомої довжини зигзагів L_{specific} (яка характеризує щільність Z-структур на плівці) змінюється з концентрацією Cl^- (від 20 до 0 мМ) та з концентрацією F^- і Br^- (від 0 до 20 мМ) у вихідних розчинах.

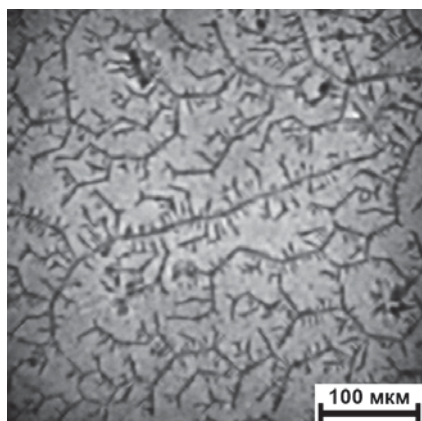


(а)

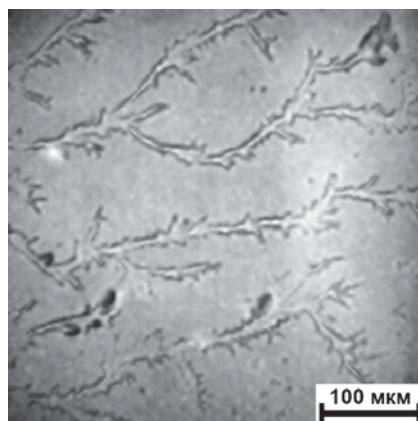


(б)

Рисунок 3.7. Плівка, отримана з розчину БСА + 20 мМ NaCl ($T = 40^\circ\text{C}$, ВВ = 0%): (а) центральна частина; (б) периферійна частина.

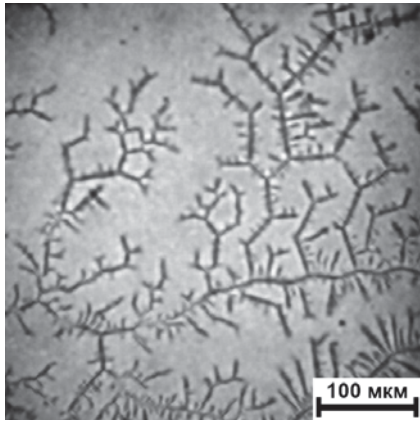


(а)

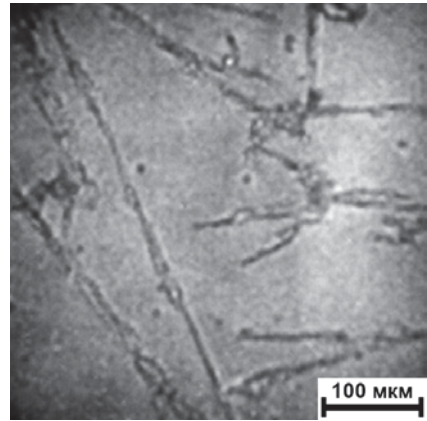


(б)

Рисунок 3.8. Плівки, отримані з (а) розчину БСА + 12 мМ NaCl + 8 мМ NaF; (б) розчину БСА + 20 мМ NaF.



(а)



(б)

Рисунок 3.9. Плівки, отримані з (а) розчину БСА + 12 мМ NaCl + 8 мМ NaBr; (б) розчину БСА + 20 мМ NaBr.

Розподіл Z-структур на поверхні плівок показано на рис. 3.10 і 3.11 у вигляді тривимірних графіків.

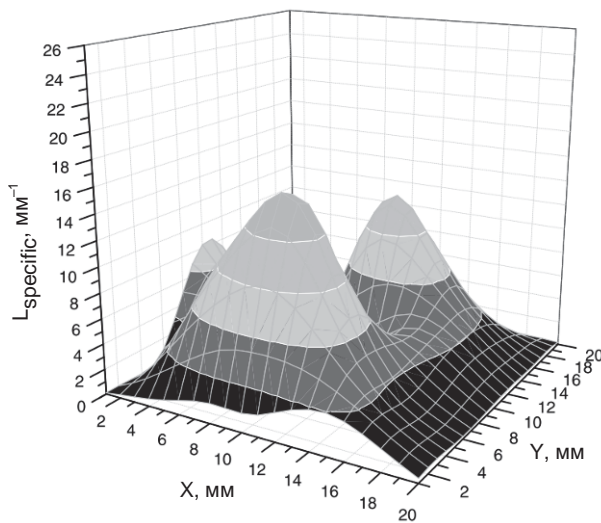


Рисунок 3.10. Розподіл щільностей Z-структур на плівках БСА + 12 мМ NaCl + 8 мМ NaBr.

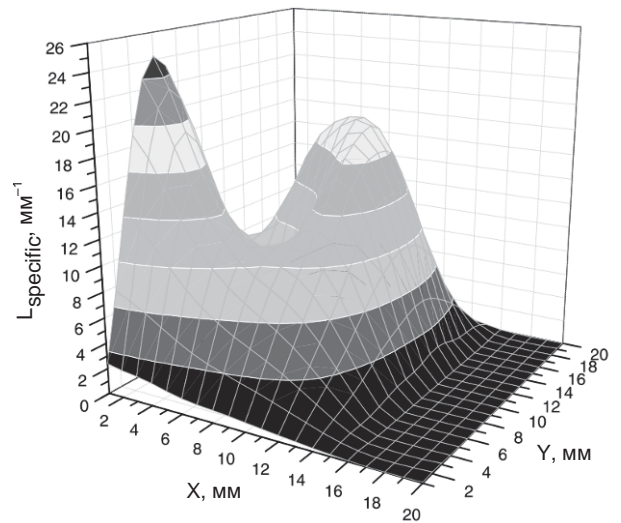
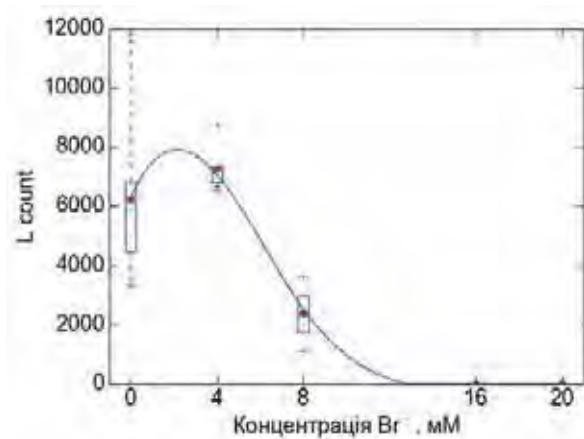
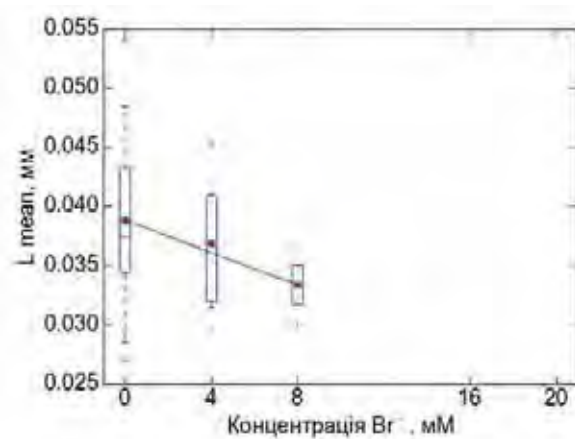


Рисунок 3.11. Розподіл щільностей Z-структур на плівках БСА + 12 мМ NaCl + 8 мМ NaF.

Заміна NaCl на NaBr (рис. 3.12) призводить до зменшення L_{count} при 8 мМ NaBr і до зникнення зигзагів при 16 мМ або більше NaBr, тоді як θ_{mean} і L_{mean} не виходять за межі контрольних значень.



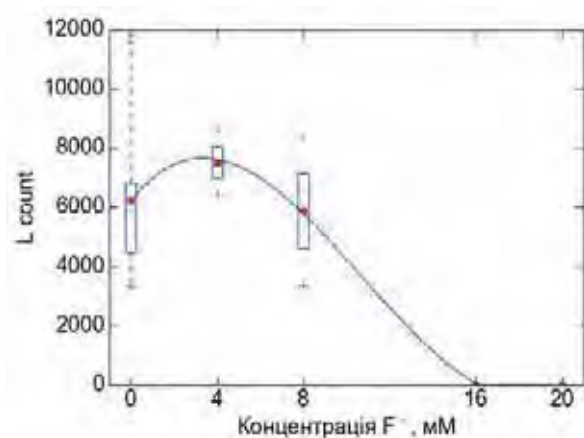
(a)



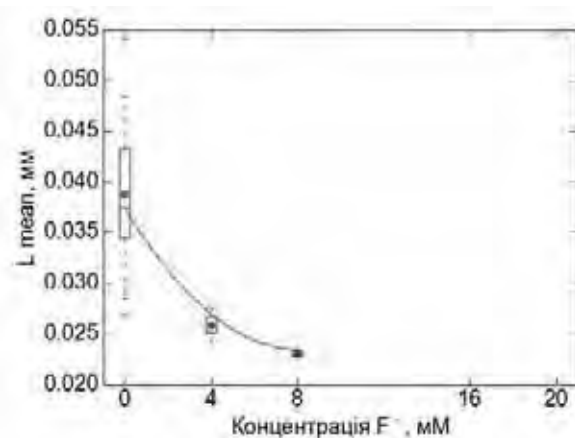
(б)

Рисунок 3.12. Характеристики патернів при заміні NaCl на NaBr: (а) кількість сегментів зигзагів; (б) середня довжина сегментів зигзагів. Позначення елементів коробкового графіка див. у додатку 2.

Заміна NaCl на NaF (рис. 3.13) призводить до зменшення L_{mean} при 4 мМ і 8 мМ NaF і до зникнення зигзагів при 16 мМ або більше NaF, тоді як θ_{mean} не виходить за межі контрольних значень.



(a)



(б)

Рисунок 3.13. Характеристики патернів при заміні NaCl на NaF: (а) кількість сегментів зигзагів; (б) середня довжина сегментів зигзагів. Позначення елементів коробкового графіка див. у додатку 2.

При 4 мМ Cl^- (20% від стандартної концентрації) і нижче зигзаги не утворюються, що свідчить про високу специфічність зигзагоподібного режиму агрегації до фізичних параметрів аніонів (розмір, поверхневий заряд тощо). Виходячи з цього, можна зробити висновок, що саме наявність Cl^- в розчині створює умови, при яких утворюються зигзагоподібні структури під час висихання плівок. Br^- та F^- не створюють умов для формування зигзагоподібних патернів, але їхня присутність має різні ефекти: при 8 мМ Br^- кількість сегментів зигзагів помітно зменшується, тоді як F^- помітно зменшує середню довжину сегментів зигзагів.

Контрольні експерименти показали, що висушування розчину 20 мМ NaCl без ДНК або білка за розробленою у роботі методикою не призводить до утворення зигзагоподібних структур (рис. 3.14), що підтверджує участь біополімерів у формуванні цих патернів.

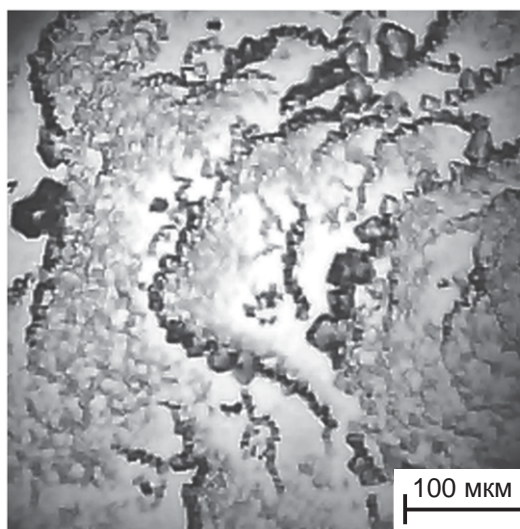


Рисунок 3.14. Фотографія плівки, отриманої з розчину 20 мМ NaCl .

Відомо, що взаємодія між біополімерами і солями викликає усунення молекул води з гідратної оболонки молекул білка, а також зміну його структури. Деякі солі дестабілізують, а інші стабілізують структуру біополімерів і впливають на їхню ступінь гідrataції [167]. Різниця в дії галогенідів на БСА, можливо, пов'язана зі структурними змінами та змінами

ступеня гідратації БСА, а також з характером електростатичних взаємодій між БСА та іонами [79]. Для уточнення характеру впливу F^- , Cl^- і Br^- на БСА були проведені дослідження УФ-спектрів і спектрів флуоресценції розчинів БСА в присутності солей галогенідів натрію (NaF, NaCl і NaBr).

На рис. 3.15 наведено спектри поглинання БСА поблизу смуги поглинання $\lambda \sim 280$ нм. Можна бачити, що в присутності іонів F^- і Br^- інтенсивність смуги поглинання зростає приблизно на 8% ($\pm 2\%$). Це говорить про те, що ці іони модифікують як поверхнєве оточення білка, так і його структурний стан.

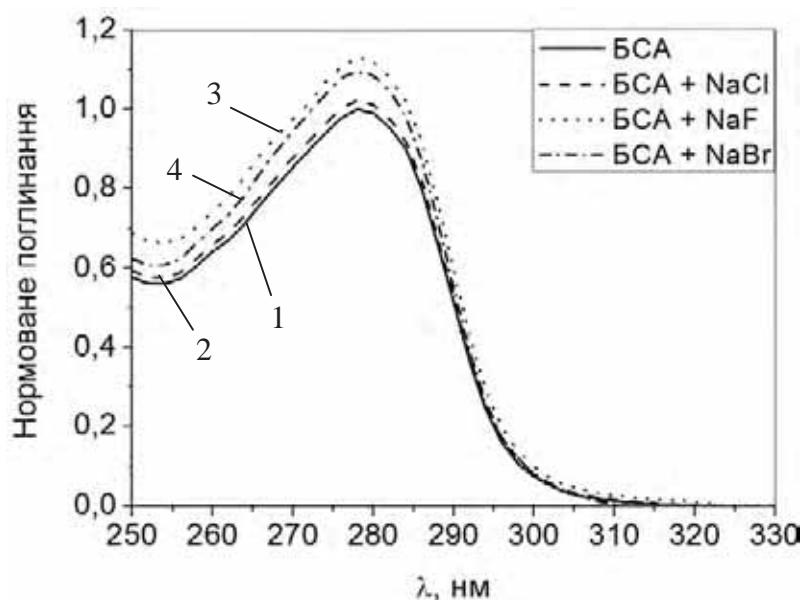


Рисунок 3.15. Спектри УФ-поглинання. (1) 10 мг/мл БСА; (2) 10 мг/мл БСА + 0,4 М NaCl; (3) 10 мг/мл БСА + 0,4 М NaF; (4) 10 мг/мл БСА + 0,4 М NaBr.

На рис. 3.16 наведено спектри флуоресценції розчинів БСА в присутності галогенідів натрію. Смуги флуоресценції зразків порівнювали за їхньою "ефективною" інтенсивністю флуоресценції: відношення $I' = I_{\max}^{fl} / A_{exc}$ інтенсивності I_{\max}^{fl} в максимумі випромінювання смуги до оптичної щільності A_{exc} в точці збудження (280 нм).

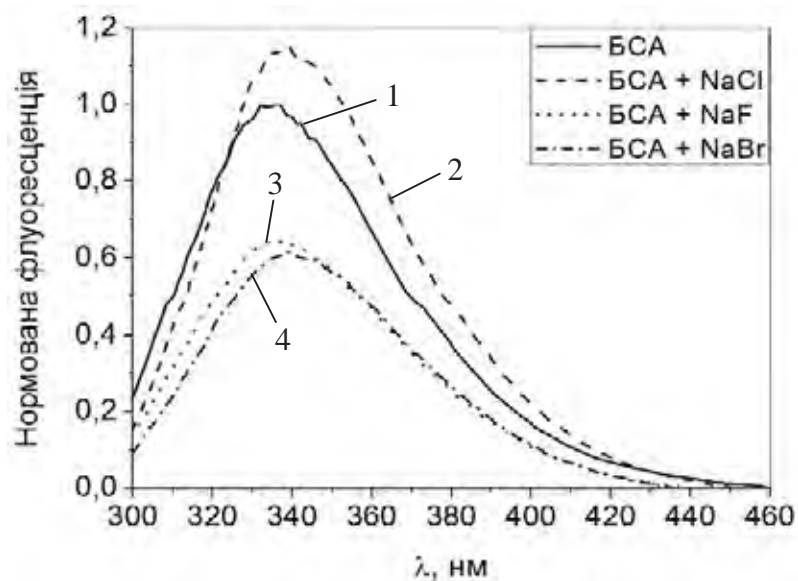


Рисунок 3.16. Спектри флуоресценції. (1) 10 мг/мл БСА; (2) 10 мг/мл БСА + 0,4 М NaCl; (3) 10 мг/мл БСА + 0,4 М NaF; (4) 10 мг/мл БСА + 0,4 М NaBr.

Таблиця 3.1 показує, що в присутності NaCl I' збільшується, в той час як в присутності NaF і NaBr I' зменшується (на ту ж величину в обох випадках).

Таблиця 3.1.

"Ефективна" інтенсивність флуоресценції зразків.

Зразок	$I' = I_{\max}^f / A_{\text{exc}}$
БСА 10 мг/мл	0,33±0,04
БСА 10 мг/мл + NaBr 0,4 М	0,25±0,04
БСА 10 мг/мл + NaCl 0,4 М	0,44±0,04
БСА 10 мг/мл + NaF 0,4 М	0,25±0,04

Відомо, що люмінесценція БСА в основному складається з люмінесценції триптофану (молекула БСА містить два залишки триптофану, які вносять значний вклад в флуоресценцію білка: Trp-134, який локалізований поблизу поверхні домену ІВ, і Trp-212, який занурений в гідрофобну кишеню у внутрішній частині домену ІІА [168]). Інтенсивність

флуоресценції може зменшуватися (гасіння флуоресценції) або збільшуватися в результаті взаємодії БСА з іонами. Наприклад, негативні заряди знижують інтенсивність флуоресценції, в той час як позитивні заряди мають протилежний ефект [169, 170]. Тільки Trp-214 може гаситися йодидом, в той час як Trp-134, як правило, захищений [171]. Крім того, збільшення іонної сили розчину за рахунок 2 М NaCl зменшує ефект гасіння йодиду; вважається, що це є результатом зниженого електростатичного тяжіння і, можливо, конкуренції F^- і Br^- за одні й ті ж ділянки зв'язування в БСА [172]. Таким чином, зміна інтенсивності флуоресценції вказує на зміни в мікрооточенні триптофану. У нашому випадку зменшення інтенсивності флуоресценції в присутності солей NaF і NaBr може, вочевидь, бути віднесене до тих же ефектів, що й гасіння йодидом – тобто гасіння флуоресценції Trp-134 (який знаходиться на поверхні білка) іонами F^- і Br^- .

Стан молекул води, що оточують БСА, було досліджено за допомогою мікрохвильової діелектрометрії, яка, як відомо, чутлива до молекул води в розчині. На рис. 3.17 наведено значення статичної діелектричної проникності ϵ_s досліджуваних зразків і частоти діелектричної релаксації f_d молекул води в них.

У білкових або сольових розчинах величина ϵ_s визначається кількістю вільної води. f_d характеризує рухливість молекул води в розчині, яка, в свою чергу, визначається характером міжмолекулярних взаємодій. Розглядаючи обидва чинники, можна отримати інформацію про стан гідратної оболонки білка в зразках. Наприклад, 0,4 М розчин NaF має максимальне значення ϵ_s і мінімальне значення f_d порівняно з іншими сольовими розчинами. Виходячи з цього, можна зробити висновок про те, що числа гідратації F^- менше чисел гідратації Cl^- і Br^- . Розрахунки мінімальних чисел гідратації методом, описаним в роботі [173], показали, що NaF зв'язує 10,5 молекули води, а NaCl та NaBr зв'язують 12,6 та 11,8 молекул води, відповідно. Згідно з даними молекулярної динаміки, сума середніх чисел гідратації першої гідратної оболонки становить 12,3 для Na^+ і F^- , 13,3 для Na^+ і Cl^- і 13,1 для Na^+ і Br^- [174].

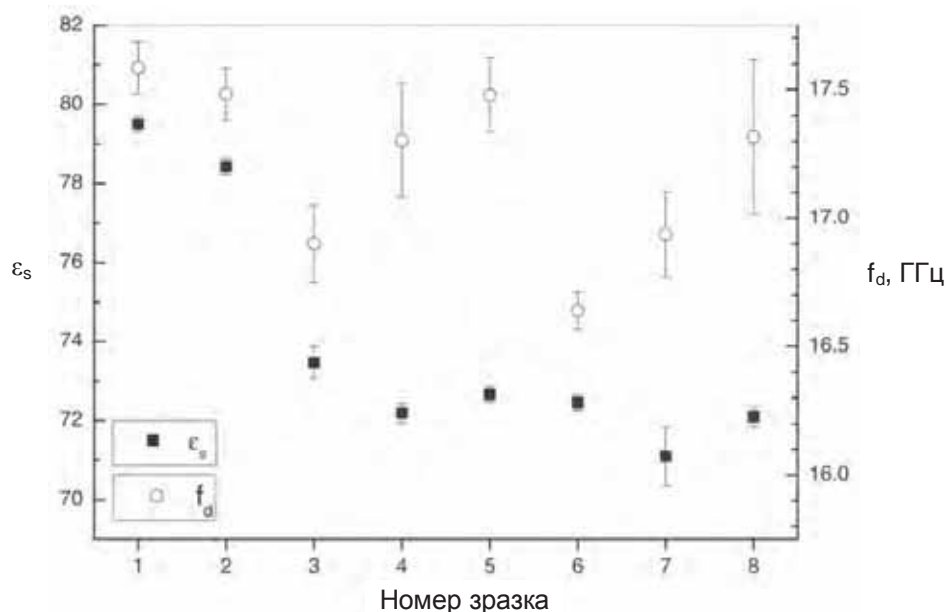


Рисунок 3.17. Статична діелектрична проникність ϵ_s зразків та стандартне відхилення при температурі $22,9\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$. 1 – дистилат (H_2O); 2 – розчин 10 мг/мл БСА без солей; 3 – розчин 0,4 М NaF; 4 – розчин 0,4 М NaCl; 5 – розчин 0,4 М NaBr; 6 – розчин 10 мг/мл БСА з 0,4 М NaF; 7 – розчин 10 мг/мл БСА з 0,4 М NaCl; 8 – розчин 10 мг/мл БСА з 0,4 М NaBr.

Таким чином, отримані числа гідратації нижче середнього значення, отриманого з молекулярної динаміки. У нашому випадку це пов'язано з молекулами води, які не беруть участі в процесі дипольної релаксації. Їхній час життя, очевидно, вище середнього часу життя (як повідомлялося в [174]) молекул води в першій гідратній оболонці іонів. Частота діелектричної релаксації вільних молекул води в розчинах солей менше, ніж у чистій воді.

Це свідчить про те, що іони знижують рухливість вільних молекул води в розчинах. У ряді F^- , Cl^- , Br^- рухливість вільних молекул води збільшується, що погоджується з розміром і поверхневим зарядом іонів. Різниця в молекулярній рухливості вільної води виникає через різну середню кількість водневих зв'язків на молекулу води при даній температурі.

Дійсно, добре відомо, що Na^+ і F^- збільшують, а Cl^- і Br^- зменшують кількість водневих зв'язків (по відношенню до чистої води при тій же температурі), причому Br^- має більший ефект, ніж Cl^- [175]. Наші дані

узгоджуються з цими фактами. Все це справедливо і для розчинів БСА з NaF, NaCl і NaBr.

Загалом, білкові молекули і солі вносять адитивний вклад до значень ϵ_s та f_d сольових розчинів БСА. Слід також зазначити, що розчин БСА з 0,4 М NaCl має найменше значення ϵ_s порівняно з іншими солями. Це пов'язано з найбільшою кількістю зв'язаної води в даному зразку, що може грати ключову роль у формуванні текстур. Після випаровування всієї вільної води, зразки з різними солями міститимуть різну кількість зв'язаної води. Молекули БСА та іони, ймовірно, конкурують за цю воду, причому характер конкуренції залежить від кількості зв'язаної води в системі. Це, в свою чергу, буде визначати характер електростатичних взаємодій в системі і характер взаємодії між її компонентами. В кінцевому рахунку, ці взаємодії будуть проявлятися на макрорівні у вигляді різних типів текстур на поверхні отримуваних плівок.

Органічні молекули володіють здатністю утворювати гідрати (яка корелює з площею полярної поверхні молекул [176]). Так як ДНК і білки володіють значною кількістю полярних груп, навіть після повного випаровування розчину в структурі отриманої плівки помітний відсоток становитимуть молекули води. З іншого боку, присутні у вихідному розчині аніони та катіони також асоціюються з молекулами води і біополімерами за рахунок нековалентних взаємодій. Це означає, що плівка, фактично, складається з комплексів біополімер-вода-сіль, як в ділянках з текстурями, так і в ділянках без видимих текстур. Текстури, в свою чергу, є неоднорідностями розподілу цих комплексів по поверхні підкладки, обумовлені ростом агрегаційних або кристалічних структур у пересиченому розчині. Зокрема, цей висновок узгоджується зі спостереженням, що нижче певної концентрації NaCl площа текстур помітно знижується [119].

У роботі [177] описана загальна методика отримання кристалів білків. Відповідно до неї, наш спосіб утворення кристалічних білкових структур складається як в додаванні солі у вихідний розчин, так і в висушуванні, що

призводить до пересичення розчину. Таким чином, сформовані структури з нативного білка, що знаходиться у вихідному розчині, по суті, складаються з кристалічних білкових структур.

Важливо мати на увазі, що біополімери можуть формувати кристали (гратчаста структура яких підтримується завдяки водневим зв'язкам біополімеру з упорядкованою і неупорядкованою водою [178]), і ця здатність в значній мірі залежить від однорідності (монодисперсності) молекул білка або ДНК [177, 179, 180]. В нашому випадку висушування призводить до перенасиченості розчину, що, як відомо, є основною передумовою кристалізації, зокрема кристалізації білків [177]. Оскільки, відповідно до моделі [54], зигзагоподібні патерни утворюються в результаті швидкого росту кристала в одному з кристалографічних напрямків, ступінь однорідності біополімеру може виступати одним з критичних чинників, що визначають ріст Z-патернів на плівці. Зокрема, це означає, що дестабілізація структури, фрагментація та агрегація біополімеру повинні позначатися на формуванні зигзагів.

У роботі [181] було показано, що в умовах відсутності вільної води іони хлору стабілізують білок краще, ніж іони фтору і йоду. У висушених плівках вільна вода зникає не повністю [182], але її значно менша кількість, можливо, дозволяє стабілізуючому ефекту хлору проявлятися значно більш помітно.

Плівки, отримані з розчину білка та хлориду натрію, мають на своїй поверхні зигзагоподібні патерни, тоді як плівки, отримані з розчинів білка та хлориду фтору або бромиду (який в ряду Гофмейстера близький до йоду [183]) не містять цих патернів. Оскільки стабільність структури білка впливає на здатність білка до кристалізації [184], це може слугувати одним з можливих пояснень отриманих результатів. Зокрема, зниження кількості або середньої довжини сегментів при заміні 40% хлору на бром або фтор дозволяє припустити, що у такому співвідношенні дестабілізуючий вплив фтору та бромиду вже починає переважати над стабілізуючим ефектом хлору.

3.4 Подвоєння концентрації БСА і NaCl

Для дослідження впливу на характеристики текстур концентрації компонентів розчину (при збереженні співвідношення між концентраціями компонентів) було порівняно плівки 0,5 мг/мл БСА + 20 мМ NaCl (контроль) з плівками 1 мг/мл БСА + 40 мМ NaCl [6] (рис. 3.18).

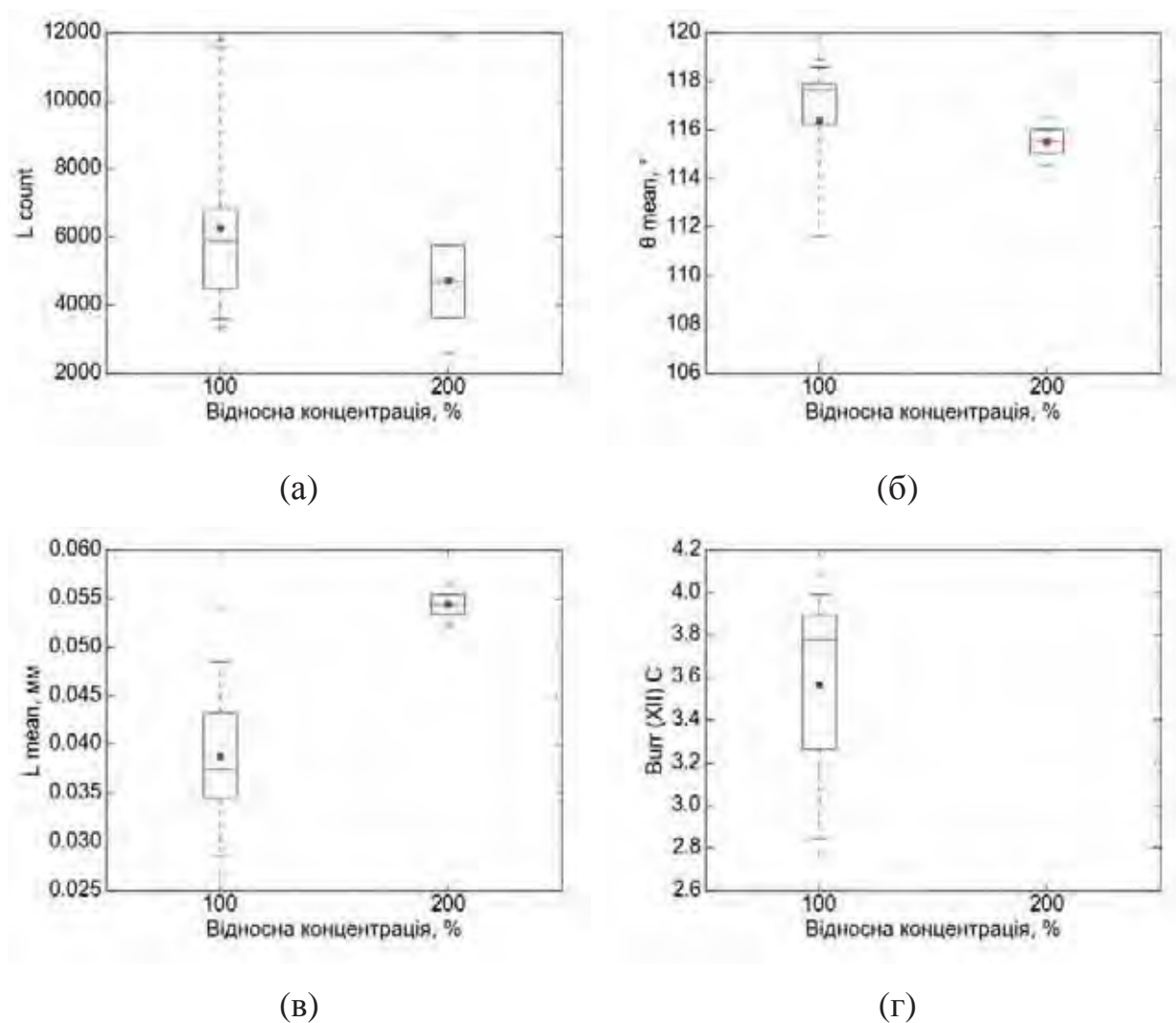


Рисунок 3.18. Характеристики патернів при контрольних (0,5 мг/мл БСА + 20 мМ NaCl) і подвоєних (1 мг/мл БСА + 40 мМ NaCl) концентраціях компонентів біополімерного розчину: (а) кількість сегментів зигзагів; (б) середній кут між сегментами зигзагів; (в) середня довжина сегментів зигзагів; (г) параметр форми С розподілу Burr^{XII}. Позначення елементів коробкового графіка див. у додатку 2.

L_{count} (рис. 3.18 а) та θ_{mean} (рис. 3.18 б) залишаються в діапазоні значень контролю, тоді як L_{mean} (рис. 3.18 в) зростає, а параметр $\text{Burr}^{\text{XII}} \text{C}$ (рис. 3.18 г) зменшується (зменшення $\text{Burr}^{\text{XII}} \text{C}$ відповідає "розтягуванню" розподілу і зміщенню у бік більших значень). Зростання середньої довжини сегментів дозволяє припустити (на підставі моделі, наведеної в [54]), що більш висока концентрація компонентів дозволяє кристалам рости в одному напрямку протягом більш тривалого часу.

Висновки до розділу 3

1. Органічні компоненти буферних розчинів Трис і ЕДТО перешкоджають формуванню текстур, що виключає можливість їх використання при приготуванні плівок.

2. Наявність катіонів Na^+ не критична для формування Z-патернів (можуть бути використані K^+ або Rb^+), тоді як аніон Cl^- є критичним для цього процесу (при заміні на F^- або Br^- , Z-патерни не утворюються).

3. Визначено, що середня довжина сегментів переважно залежить від концентрації аніонів хлору.

4. Зникнення Z-патернів корелює зі зміною структурного стану (зростання УФ-поглинання при заміні Cl^- на F^- і Br^-) та поверхневого середовища білкової глобули (гасіння флуоресценції залишка триптофана Trp-134 іонами F^- і Br^-).

5. Кількість зв'язаної води може бути одним з факторів, які впливають на формування Z-патернів, оскільки від неї залежить характер електростатичних взаємодій в розчині (статична діелектрична проникність ϵ_s для розчинів NaCl менше, ніж для розчинів NaF і NaBr, плівки яких не утворюють Z-патернів).

Результати досліджень даного розділу наведено в публікаціях здобувача: [1], [3], [6], [8], [9], [18].

РОЗДІЛ 4

ВПЛИВ ОРГАНІЧНИХ І НЕОРГАНІЧНИХ ДОМІШОК НА СТРУКТУРНИЙ СТАН БІОПОЛІМЕРІВ ТА ТЕКСТУРИ ЇХНІХ ПЛІВОК

Одним з напрямків застосувань ДНК і білків у біофізиці є використання їхніх розчинів як модельних систем для розгляду впливу органічних та неорганічних БАР на молекулярному рівні. Оскільки концентрації розчинів біополімерів у результаті висушування досягають величин, порівнянних з концентраціями *in vivo* [185], вивчення зв'язку між станом біополімеру і текстурями, що формуються на плівці, може представляти інтерес для більш глибокого розуміння процесів самоорганізації в таких системах. Отримана в ході таких досліджень інформація також може бути корисна при розвитку методу аналізу текстур для використання в фармакологічній промисловості або токсикології.

4.1 Вплив іонів срібла і наночастинок срібла на ДНК та текстури

Наночастки срібла (НС) використовуються як антибактеріальний засіб [186] і можуть бути перспективними при лікуванні онкологічних захворювань [187], тому токсичність срібла та його вплив на генетичний матеріал клітини є актуальним предметом досліджень [188-192]. Механізм біологічної дії іонів срібла визначається переважно їхньою взаємодією з ДНК і полягає в утворенні комплексів з ДНК [81].

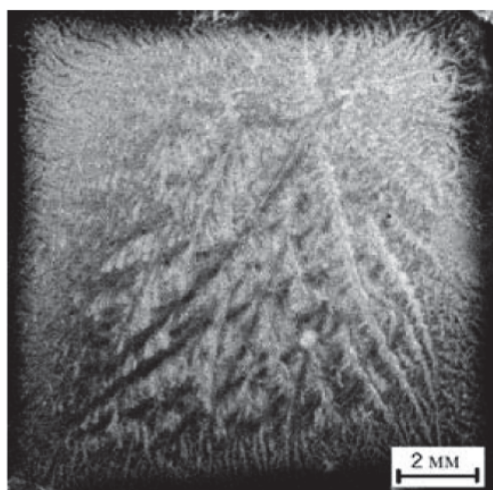
Для дослідження впливу іонів срібла і наночастинок срібла на ДНК та текстури плівок ДНК був проведений порівняльний аналіз площ текстур на поверхні плівок і УФ-спектрів відповідних розчинів та ІЧ-спектрів їх плівок [4].

Загальні фотографії та мікрофотографії відповідних текстур плівок наведені на рис. 4.1, 4.2, 4.3. Плівки були отримані з таких розчинів:

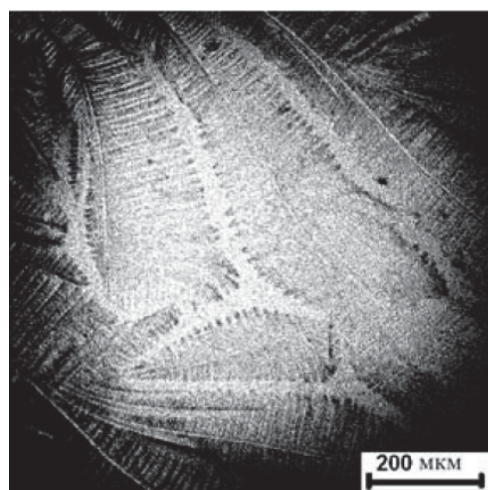
- 0,2 мг/мл ДНК + 0,03 М NaNO_3 (рис. 4.1 а, б);
- 0,2 мг/мл ДНК + 0,03 М NaNO_3 + $5,05 \cdot 10^{-5}$ М AgNO_3 (рис. 4.2 а, б);
- 0,2 мг/мл ДНК + 0,03 М NaNO_3 + 15 мкг/мл ($7,0 \cdot 10^{-8}$ М) НС (рис. 4.3 а, б).

Для приготування розчинів використовувалися хімічно чисті реагенти NaNO_3 , AgNO_3 та суспензія НС розміром 4 нм (отримана у Фізико-технічному інституті ім. А. Ф. Іоффе РАН, Санкт-Петербург). ДНК витримувалося в розчині відповідної солі або НС протягом 12 годин при температурі 8–10 °С, після чого розчин розміщувався протягом 8 годин.

У порівнянні з площею текстур на поверхні контрольної плівки ($62 \pm 2\%$ від площі всієї плівки, рис. 4.1) площа текстур на поверхні плівки з AgNO_3 (рис. 4.2) становить $32 \pm 2\%$ від площі всієї плівки (зменшується на $\sim 50\%$), а площа текстур на поверхні плівки з наносріблом (рис. 4.3) становить $35 \pm 2\%$ від площі всієї плівки (також зменшується на $\sim 50\%$). З цих даних можна зробити висновок, що зменшення площ текстур пов'язане зі взаємодією як іонів срібла з молекулами ДНК, так і молекулярного срібла на поверхні часток НС з молекулами ДНК. Оскільки такого роду взаємодія має мутагенний характер [193, 194], то можна припустити, що текстури на плівці утворюються композитами солей з молекулами ДНК у денатурованому стані.

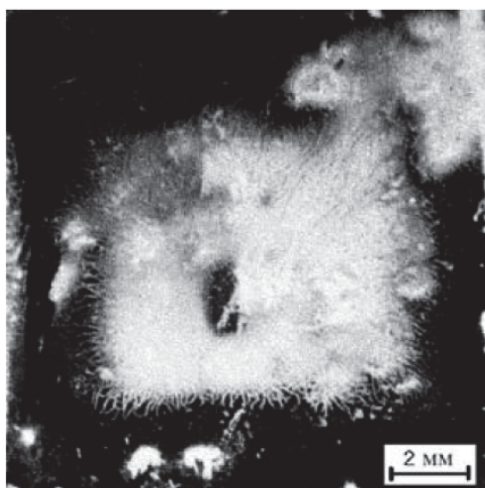


(а)

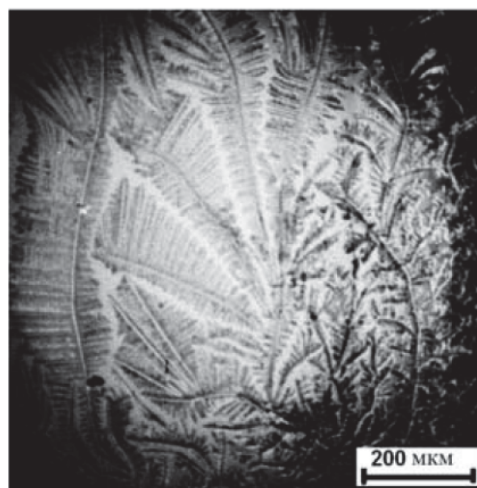


(б)

Рисунок 4.1. Плівка, отримана з розчину 0,2 мг/мл Na-ДНК + 0,03 М NaNO_3 ($T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$, $ВВ = 30\% \pm 2\%$): (а) загальна фотографія; (б) мікрофотографія.

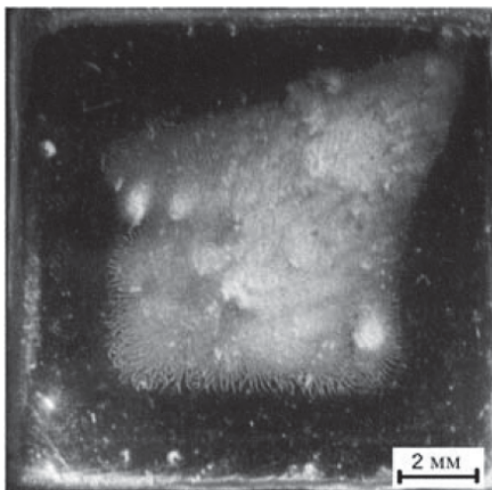


(a)

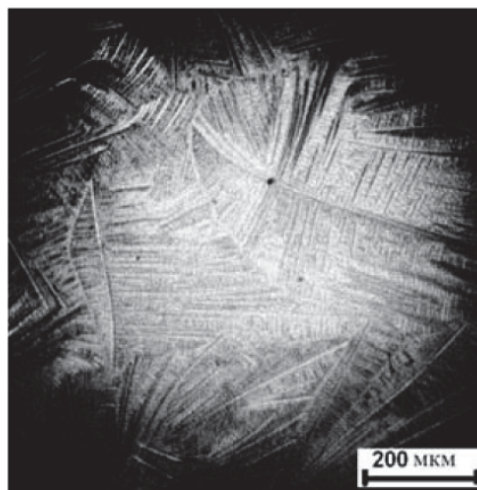


(б)

Рисунок 4.2. Плівка, отримана з розчину $0,2 \text{ мг/мл Na-ДНК} + 0,03 \text{ М NaNO}_3 + 5,05 \cdot 10^{-5} \text{ М AgNO}_3$ ($T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$, $ВВ = 30\% \pm 2\%$): (a) загальна фотографія; (б) мікрофотографія.



(a)



(б)

Рисунок 4.3. Плівка, отримана з розчину $0,2 \text{ мг/мл Na-ДНК} + 0,03 \text{ М NaNO}_3 + 15 \text{ мкг/мл НС}$ ($T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$, $ВВ = 30\% \pm 2\%$): (a) загальна фотографія; (б) мікрофотографія.

Для з'ясування цих припущень були проведені дослідження УФ-спектрів розчинів, з яких готувалися плівки ДНК з іонами срібла і НС.

Як відомо, іони Na^+ стабілізують структуру ДНК в розчині, при цьому гіпохромізм при тепловій денатурації становить 38-40%. Для дослідження

структури ДНК була визначена залежність оптичної густини від концентрації Ag^+ і НС на довжині хвилі $\lambda = 260$ нм. На рис. 4.4 і рис. 4.5 представлені такі залежності. Можна бачити, що зі зростанням концентрації іонів срібла і НС інтенсивність смуги зростає, що свідчить про руйнування спіральної структури ДНК. На цих же графіках показані стрілками ті концентрації розчинів ДНК з іонами Ag^+ і суспензії ДНК з НС, з яких були отримані плівки. Розрахунок гіпохромного ефекту ДНК при цих концентраціях Ag^+ і НС дає величину 26-27%, що становить 70% від повного гіпохромного ефекту нативної ДНК.

Ці дані свідчать про те, що вторинна спіральна структура ДНК була порушена, що, вірогідно, і призвело до формування різних площ текстур. Добре відомо [120, 121], що при дегідратації ДНК відбувається руйнування спіральної структури Na-ДНК. Однак при зволоженні цих плівок до 92% ВВ спіральна структура відновлюється.

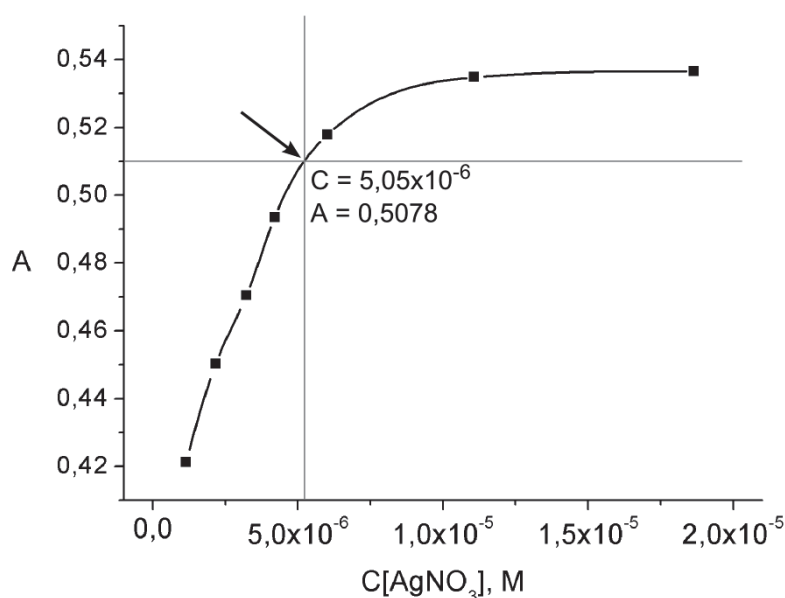


Рисунок 4.4. Залежність оптичної щільності (A) на довжині хвилі $\lambda = 260$ нм від концентрації (C) Ag^+ у зразку ДНК.

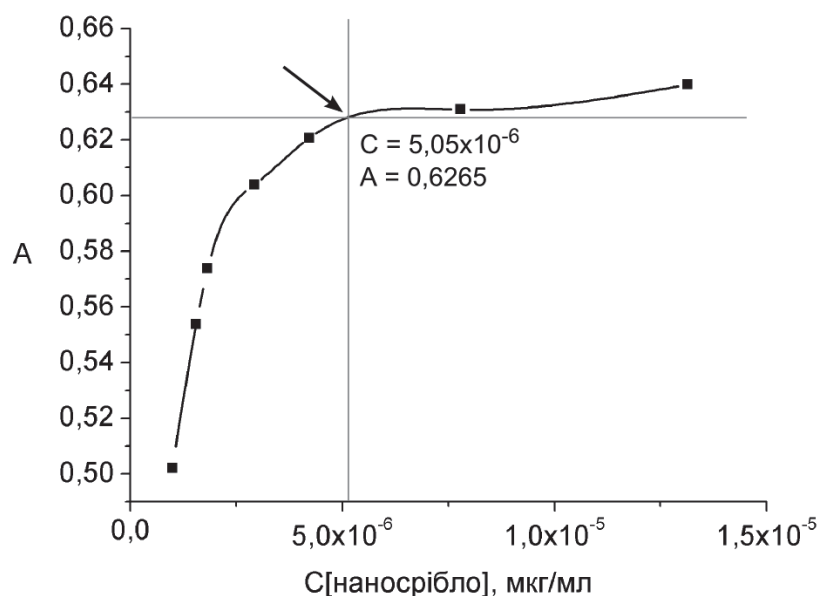


Рисунок 4.5. Залежність оптичної щільності (A) на довжині хвилі $\lambda = 260$ нм від концентрації (C) наносрібла у зразку ДНК.

У разі формування плівок ДНК з розчинів з іонами срібла і суспензій з НС, іони срібла взаємодіють з дегідратованими групами ДНК, і відбувається подальше руйнування вторинної структури при дегідратації під впливом взаємодії іонів Ag^+ і НС з ДНК.

Для підтвердження такого механізму руйнування спіральної структури ДНК частками НС були проведені дослідження ІЧ спектрів плівок ДНК з наносріблом при різних вологостях. На рис. 4.6 і рис. 4.7 наведені інфрачервоні спектри Na-ДНК і Na-ДНК з наночастками срібла.

Видно, що зі зволоженням плівок Na-ДНК переходить в В-форму ДНК при 92% відносної вологості, що визначається з формування маркерних смуг при 92% ВВ. Утворення смуги при $\nu = 1712 \text{ см}^{-1}$ свідчить про те, що азотисті основи сформували правильну міжпарну стопочну структуру В-форми ДНК [195]; формування смуги антисиметричного коливання фосфатів при $\nu = 1224 \text{ см}^{-1}$ і дезоксирибозної смуги при $\nu = 1053 \text{ см}^{-1}$ також свідчить про те, що сформувався сахарофосфатний ланцюг В-форми ДНК [195].

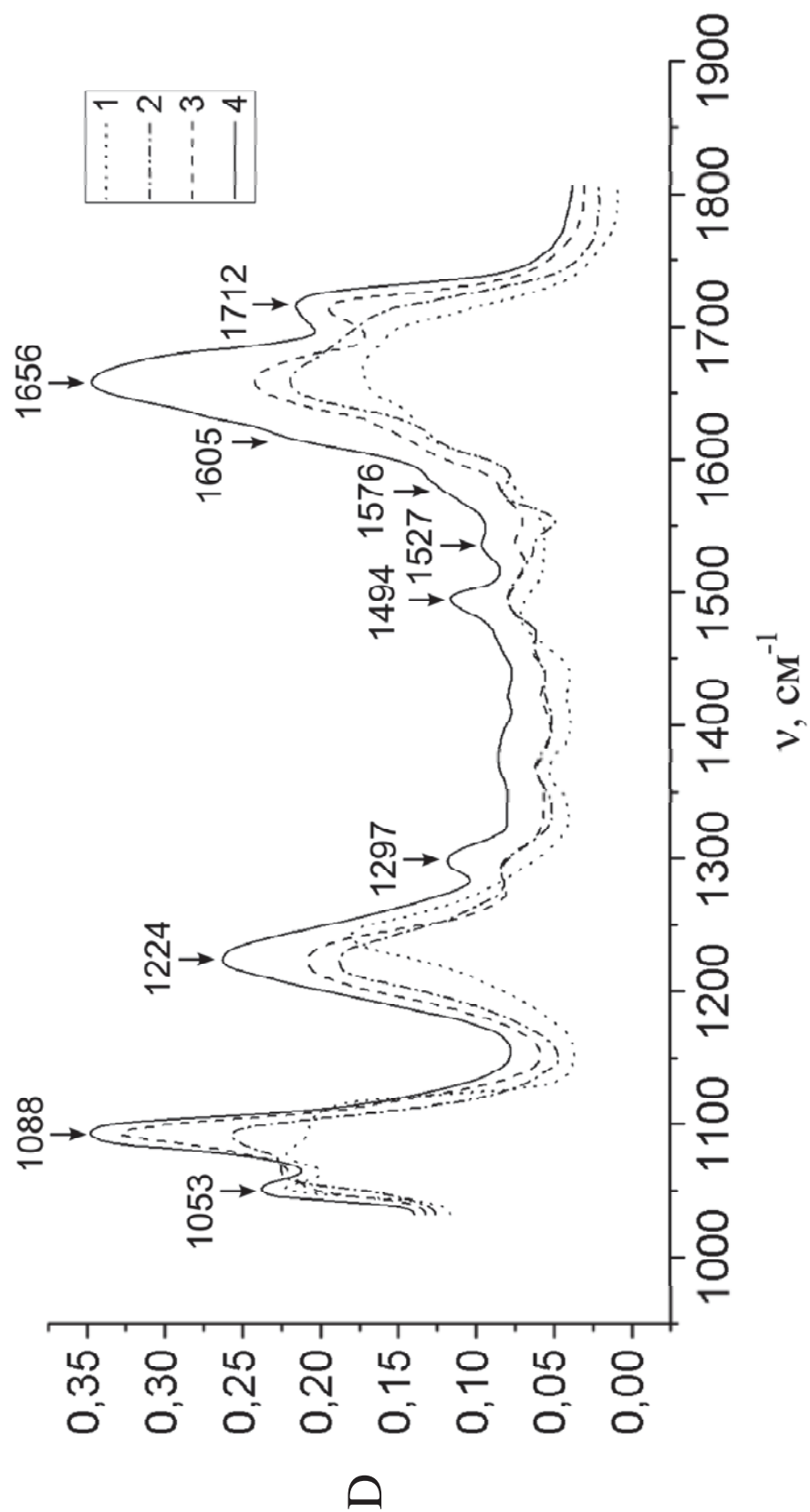


Рисунок 4.6. ІЧ-спектри плівок нативної ДНК при різних відносних вологостях: 1 – 0%, 2 – 66%, 3 – 86%, 4 – 92%.

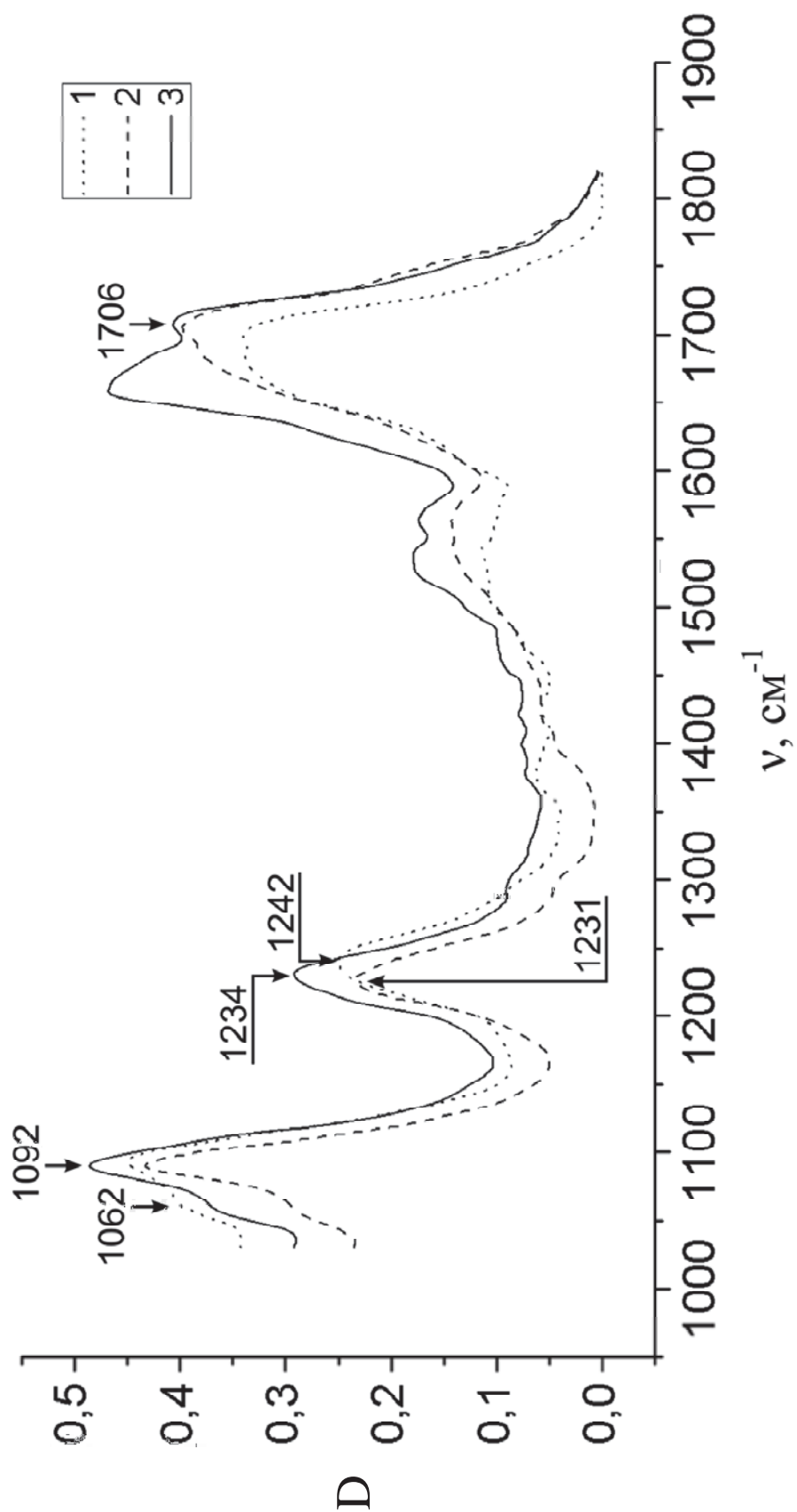


Рисунок 4.7. ІЧ-спектри плівок ДНК з наночастками срібла при різних відносних вологостях: 1 – 40%, 2 – 76%, 3 – 92%.

Однак, як видно з рис. 4.7, при тій же вологості (92% ВВ) в плівці ДНК з НС антисиметричні коливання фосфатів проявилися на частоті $\nu = 1234 \text{ см}^{-1}$, що не характерно для В-форми ДНК; смуга з $\nu = 1712 \text{ см}^{-1}$ відсутня, відсутня також смуга з $\nu = 1053 \text{ см}^{-1}$. Ці дані свідчать про те, що спіральна структура ДНК зруйнована наносріблом.

Аналогічні за зовнішнім виглядом і умовами висушування текстури ДНК описувалися в роботі [49], де отримані авторами плівки мали різкі піки в дальній ІЧ-області. Згідно з аналізом [50], різкі піки в цьому діапазоні свідчать про кристалічність ДНК [196, 197]. Дослідження ДНК при вологості 76% (форма А) і 92% (форма В) також приводять до висновку, що в цих умовах ДНК проявляє кристалічні властивості.

Пошкодження ДНК, викликані іонами та наночастками срібла, призводять до неоднорідності молекул ДНК, що послаблює їх здатність до кристалізації. Оскільки це супроводжується зменшенням площі текстур, отримані результати свідчать на користь гіпотези, що принаймні частина текстур на поверхні плівок ДНК є кристалізаційними структурами біополімерів.

4.2 Вплив Cu^{2+} і Zn^{2+} на текстури плівок ДНК

Згідно з літературними даними, іони міді призводять до порушення вторинної структури [198] та локальних пошкоджень ДНК [72], тоді як іони цинку дестабілізують водневі зв'язки між ланцюгами ДНК [199]. В зв'язку з цим було вирішено з'ясувати, як Cu^{2+} і Zn^{2+} впливають на текстури плівок ДНК.

Було визначено [18], що при додаванні 0,2 мМ CuCl_2 або 0,2 мМ ZnCl_2 до розчинів ДНК зигзагоподібні патерни не формуються (рис. 4.8, 4.9), тоді як площа та фрактальна розмірність текстур в межах похибки не змінюється порівняно з контролем. Це дає змогу припустити, що дестабілізація або пошкодження ДНК, викликана такими концентраціями Zn^{2+} або Cu^{2+} , є достатньою для порушення умов кристалізації, але не перешкоджує утворенню структур на плівці за агрегаційним механізмом.

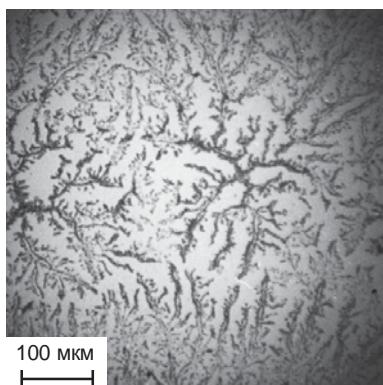


Рисунок 4.8. Фотографія плівки,
отриманої з розчину 0,2 мг/мл Na-ДНК
+ 10 mM NaCl + 0,2 mM CuCl₂

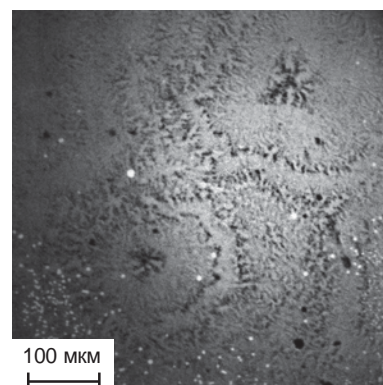
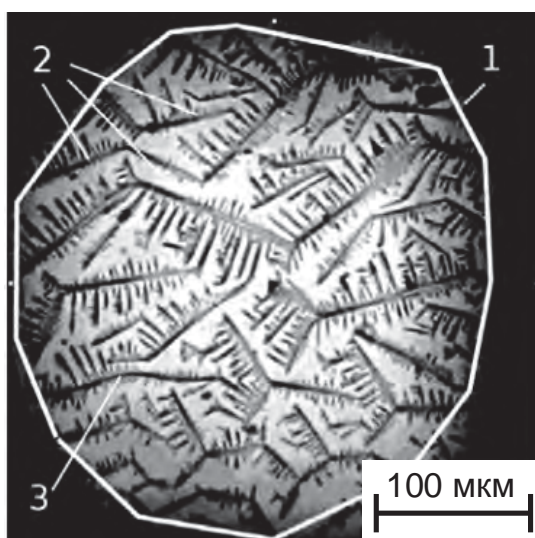


Рисунок 4.9. Фотографія плівки,
отриманої з розчину 0,2 мг/мл Na-ДНК
+ 10 mM NaCl + 0,2 mM ZnCl₂

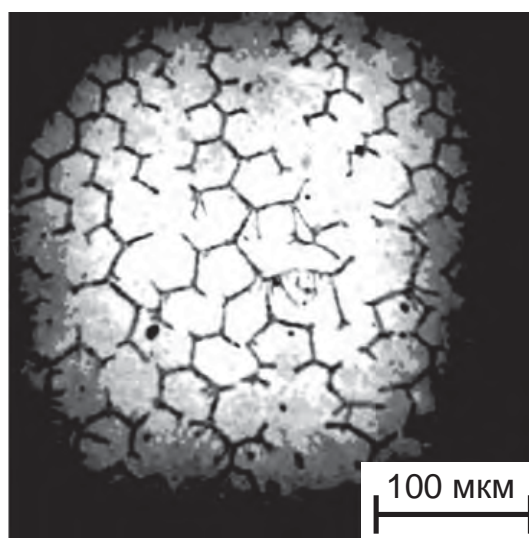
4.3 Вплив Cu²⁺ і Fe³⁺ на характеристики текстур плівок БСА

Мідь та залізо є важливими мікроелементами і виконують роль кофакторів у багатьох ферментах, але у вільному стані вони сприяють утворенню вільних радикалів [200, 201], які призводять до пошкодження біомолекул. З іншого боку, позитивно заряджені іони здатні призводити до коагуляції колоїдних частинок внаслідок компенсації поверхневого потенціалу [202–204], а продукти гідролізу солей змінюють pH [204] та можуть осаджуватися на негативно заряджених поверхнях і оточувати колоїдні частинки [202, 203].

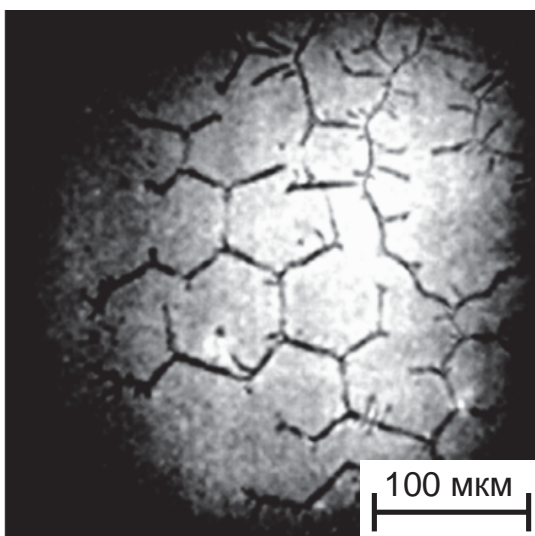
Щоб з'ясувати, як ці ефекти позначаються на текстурах плівок, були проаналізовані розподіли питомої довжини зигзагів L_{specific} та фрактальної розмірності D для плівок, отриманих з розчинів БСА з CuCl₂ і FeCl₃ [5]. Характерні мікрофотографії наведені на рис. 4.10 для контрольного розчину (0,5 мг/мл БСА + 20 mM NaCl, рис. 4.10.а), а також при додаванні 0,05 mM FeCl₃ (рис. 4.10.б), 0,05 mM CuCl₂ (рис. 4.10.в) та 0,1 mM FeCl₃ (рис. 4.10.г).



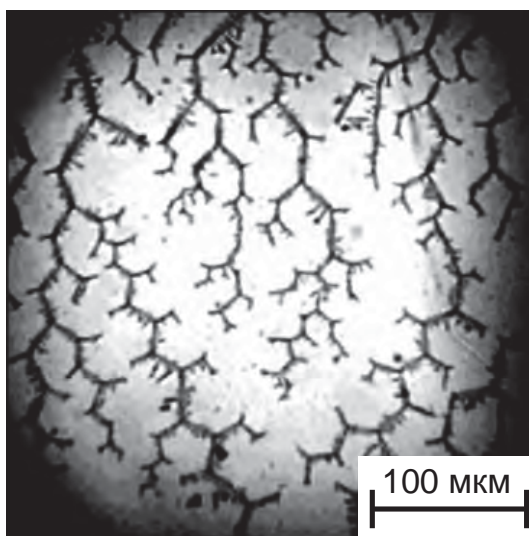
(а)



(б)



(в)



(г)

Рисунок 4.10. Характерні мікрофотографії плівок, отриманих з розчинів:
 (а) 0,5 мг/мл БСА + 20 мМ NaCl; (б) 0,5 мг/мл БСА + 20 мМ NaCl + 0,05 мМ FeCl₃;
 (в) 0,5 мг/мл БСА + 20 мМ NaCl + 0,05 мМ CuCl₂; (г) 0,5 мг/мл БСА +
 20 мМ NaCl + 0,1 мМ FeCl₃.

Значення питомої довжини зигзагів та геометричних параметрів зигзагів для цих фотографій наведені в табл. 4.1.

Значення питомої довжини зигзагів L_{specific} , середньої довжини сегментів L_{mean} і середніх кутів між сегментами θ_{mean} для фотографій на рис. 4.10.

Плівка	L_{specific} , мм ⁻¹	L_{mean} , мм	θ_{mean} , °
Контрольна плівка (рис. 4.10.а)	18,5	$0,08 \pm 0,06$	116 ± 23
0,05 мМ FeCl ₃ (рис. 4.10.б)	17,2	$0,04 \pm 0,01$	117 ± 15
0,05 мМ CuCl ₂ (рис. 4.10.в)	10,3	$0,07 \pm 0,03$	118 ± 12
0,1 мМ FeCl ₃ (рис. 4.10.г)	20,4	$0,04 \pm 0,02$	118 ± 20

Z-структури з параметрами, аналогічними наведеним на рис. 4.10.а (контрольна плівка) також присутні в центральних областях плівок з іонами міді та заліза.

Рис. 4.10.а характеризується найбільшою довжиною відрізків зигзагів і великою кількістю бічних гілок; рис. 4.10.б, 4.10.в, 4.10.г демонструють більш гексагональне розташування зигзагів практично без побічних розгалужень; нарешті, на рис. 4.10.в Z-структури мають більший розмір і розташовані менш щільно, ніж на рис. 4.10.б і 4.10.г.

Площа, яку займають Z-структури, була розрахована як площа мінімального обмежуючого багатокутника, який містить видимі елементи Z-структур. Приклад показаний на рис. 4.10.а, де мітка 1 позначає багатокутник, мітка 2 позначає Z-структури і мітка 3 позначає не-Z-структури. Таким чином, ці розрахунки площі не беруть до уваги щільність Z-структур і наявність різних видів патернів всередині виділеної області.

Розподіл питомої довжини Z-структур (L_{specific}) і фрактальної розмірності (D) текстур показані на рис. 4.11.а,б (контрольна плівка), рис. 4.12.а,б (0,05 мМ FeCl₃) і рис. 4.13.а,б (0,05 мМ CuCl₂), відповідно.

Можна відмітити, що зигзагоподібні патерни, як правило, з'являються тільки на відстані приблизно 3 мм від центру і країв комірки. Це може бути пов'язано з локальною анізотропією та розподілом солі і БСА (що визначається взаємодією дифузії, радіального потоку, сили ДЛФО і ефекту

Марангоні, а також гідродинамічними ефектами у пізній стадії сушки) [34-36, 40, 55, 57, 58, 67], у результаті чого необхідні умови для формування Z-структур створюються тільки на відстані 3-7 мм від країв комірки.

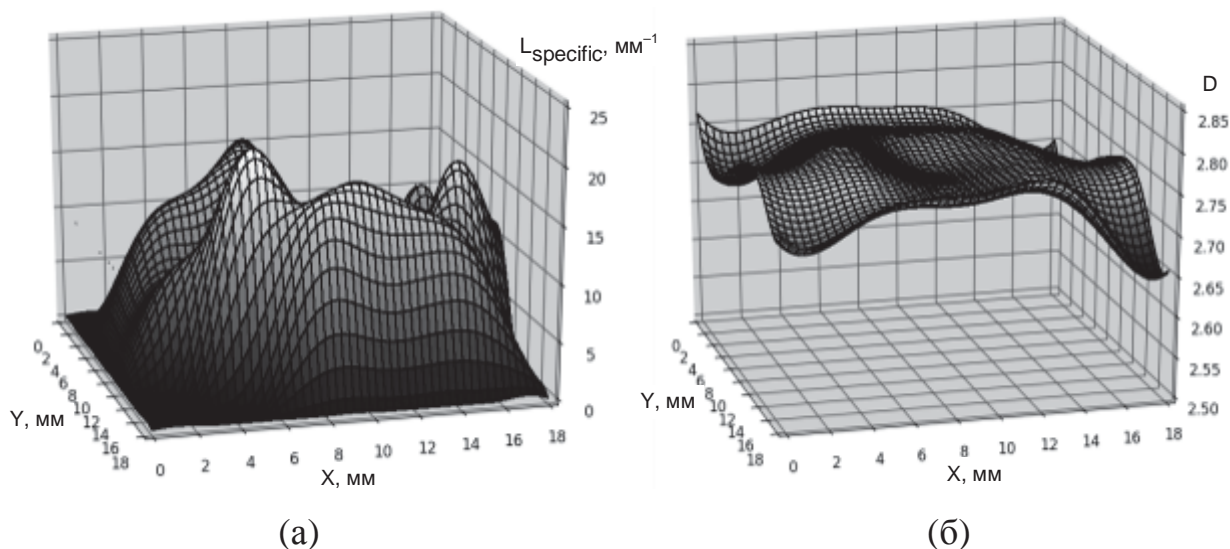


Рисунок 4.11. Усереднені розподіли (а) питомої довжини Z-структур і (б) фрактальної розмірності текстур для плівок, отриманих з розчину 0,5 мг/мл БСА + 20 мМ NaCl.

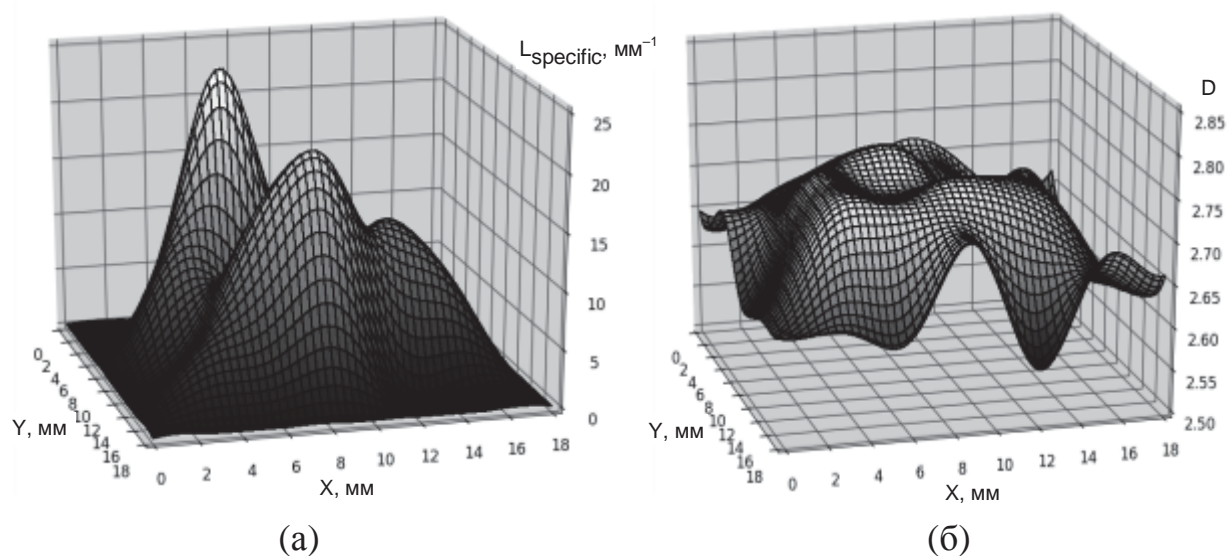


Рисунок 4.12. Усереднені розподіли (а) питомої довжини Z-структур і (б) фрактальної розмірності текстур для плівок, отриманих з розчину 0,5 мг/мл БСА + 20 мМ NaCl + 0,05 мМ FeCl_3 .

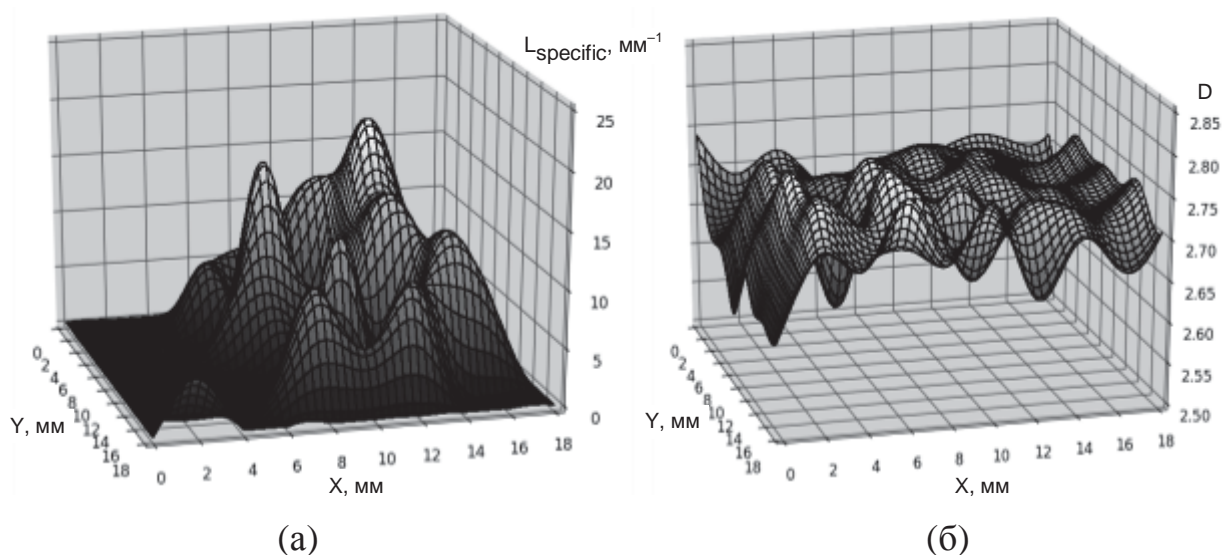


Рисунок 4.13. Усереднені розподіли (а) питомої довжини Z-структур і (б) фрактальної розмірності текстур для плівок, отриманих з розчину 0,5 мг/мл БСА + 20 мМ NaCl + 0,05 мМ CuCl₂.

Фрактальна розмірність для плівок з 0,05 мМ CuCl₂ не має великої розбіжності між центром і краями, тоді як для плівки з 0,05 мМ FeCl₃, менш складні патерни агрегації, як правило, з'являються на краях кювети.

Середні значення відносної площі текстури (S), фрактальної розмірності (D), відносної площі зигзагів (Z) та питомої довжини зигзагів (L_{specific}) наведені в таблиці 4.2 для кожного з досліджуваних розчинів.

Таблиця 4.2.

Середні значення кількісних характеристик текстур плівок.

Плівка	S	D	Z	L _{specific} , мм ⁻¹
БСА + 20 мМ NaCl	0,98±0,05	2,71±0,14	0,53±0,05	7,2±0,7
БСА + 20 мМ NaCl + 0,05 мМ FeCl ₃	0,90±0,05	2,68±0,13	0,34±0,03	6,3±0,6
БСА + 20 мМ NaCl + 0,05 мМ CuCl ₂	0,95±0,05	2,70±0,14	0,34±0,03	7,1±0,7
БСА + 20 мМ NaCl + 0,10 мМ FeCl ₃	0,84±0,04	2,67±0,13	0,46±0,05	7,2±0,7
БСА + 20 мМ NaCl + 0,20 мМ FeCl ₃	0,95±0,05	2,74±0,14	0,15±0,02	2,9±0,3

З таблиці видно, що величини S і D змінюються дуже мало для діапазону концентрацій FeCl_3 від 0 до 0,20 мМ (варіація в межах похибки), а величини Z і L_{specific} зменшуються більш ніж в 3 і 2 рази, відповідно, що говорить про більшу чутливість цих параметрів до впливу FeCl_3 .

4.4 Аналіз впливу Fe^{3+} та продуктів гідролізу FeCl_3 на БСА та характеристики зигзагоподібних патернів

Дослідження впливу FeCl_3 на БСА проводилося методом динамічного розсіювання світла (ДРС), рН-метрії, спектрометрії УФ поглинання та флуоресценції, а на текстурі плівок – методом аналізу зигзагоподібних патернів [12, 15]. Плівки отримували з розчинів 7,5 мкМ БСА з 20 мМ хлориду натрію (контрольний розчин) та у присутності 0,025 – 0,4 мМ $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Дослідження методом ДРС [15] показали, що, навіть за відсутності білків, у розчинах самого FeCl_3 з концентрацією 0,1 мМ або вище наявні позитивно заряджені колоїдні частинки з діаметром більше 100 нм (скоріш за все, утворені метагідроксидом заліза). Це може призвести до подальших помилок при інтерпретації даних ДРС, тому дослідження розчинів білка з FeCl_3 проводилися лише для концентрацій FeCl_3 0,025 і 0,05 мМ. Згідно з вимірами ДРС, у досліджуваних розчинах при концентраціях Fe^{3+} до 0,05 мМ переважають частинки неагрегованих білків діаметром 9-10 нм. ζ -потенціал частинок зменшується зі збільшенням концентрації Fe^{3+} ($\zeta_0 = -20 \pm 3$ мВ, $\zeta_{0,025} = -14 \pm 5$ мВ, $\zeta_{0,05} = -12 \pm 5$ мВ), що є типовим для колоїдних систем проявом екранування поверхневого потенціалу розчином електроліту. Крім того, величина рН знижується на 0,5 – 2 одиниці внаслідок гідролізу солі, що також впливає на нейтралізацію заряду БСА.

Додавання FeCl_3 призводить до слабкого гіпохромного зсуву довгохвильової смуги поглинання БСА від 278 нм (розчин БСА без FeCl_3) до 274 нм (розчин БСА в присутності 0,4 мМ FeCl_3) [15] та до збільшення інтенсивності УФ-поглинання [12] (рис. 4.14).

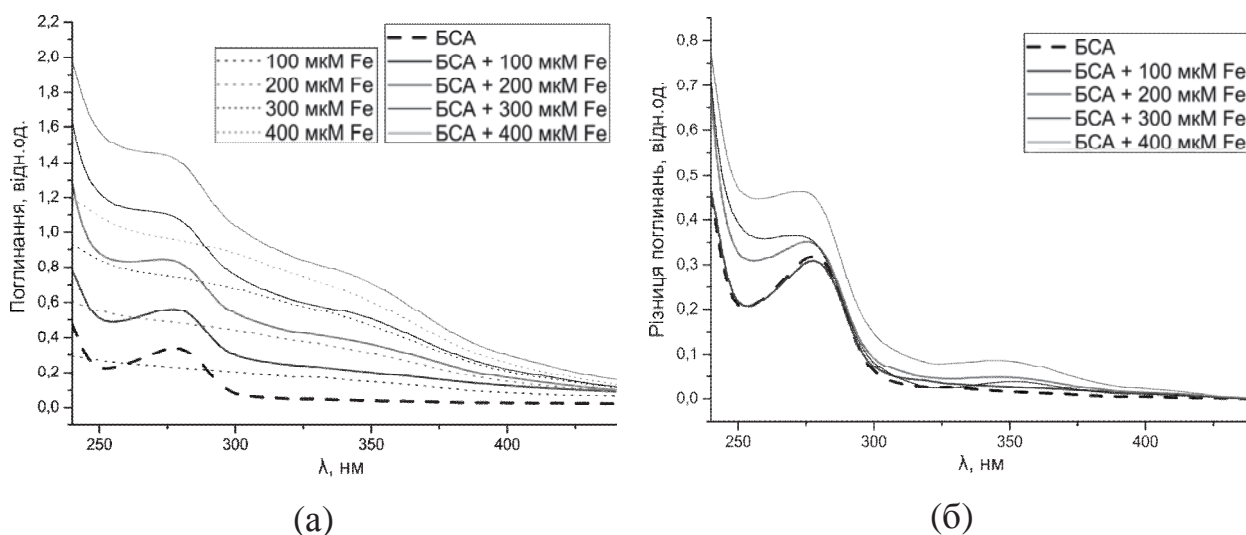


Рисунок 4.14. (а) УФ спектри поглинання розчинів Fe^{3+} і БСА + Fe^{3+} ; (б) різниця між спектрами БСА + Fe^{3+} та відповідними спектрами Fe^{3+} . 1 – БСА; 2 – БСА + 0,1 мМ FeCl_3 ; 3 – БСА + 0,2 мМ FeCl_3 ; 4 – БСА + 0,3 мМ FeCl_3 ; 5 – БСА + 0,4 мМ FeCl_3 .

Це може бути викликано як розгортанням білка (внаслідок зміни гідратації або рН), так і рН-індукованою зміною кількості колоїдного заліза [205] (що призводить до росту фонового поглинання). Смуга випромінювання в спектрі флуоресценції БСА також зазнає гіпохромного зсуву від 342 нм (розчин БСА без FeCl_3) до 332 і 326 нм для розчинів БСА, що містять 0,2 і 0,4 мМ FeCl_3 відповідно [15]. Зсув смуги випромінювання може пояснюватися як структурними змінами білкових молекул, так і частковим перепоглинанням флуоресценції амінокислотних залишків триптофану в молекулах БСА іонами Fe^{3+} . У результаті на підставі спектрів УФ-поглинання і флуоресценції не можна зробити однозначного висновку про вплив Fe^{3+} на структуру БСА.

При додаванні FeCl_3 до розчину БСА кількість сегментів зигзагів (L_{count}) змінюється (рис. 4.15), але залежності геометричних параметрів зигзагів від концентрації заліза не спостерігається. L_{count} має декілька дуже відмінних областей: до 0,15 мМ FeCl_3 L_{count} знаходиться в діапазоні контрольних значень і навіть має тенденцію до зростання; між 0,2 і 0,25 мМ FeCl_3 кількість зигзагів помітно зменшується і коливається приблизно в одному

діапазоні; при 0,3 мМ L_{count} знов зменшується, а при 0,4 мМ FeCl_3 зигзаги перестають формуватися. Водночас збільшення концентрації FeCl_3 в розчинах БСА призводить до переважання інших типів патернів.

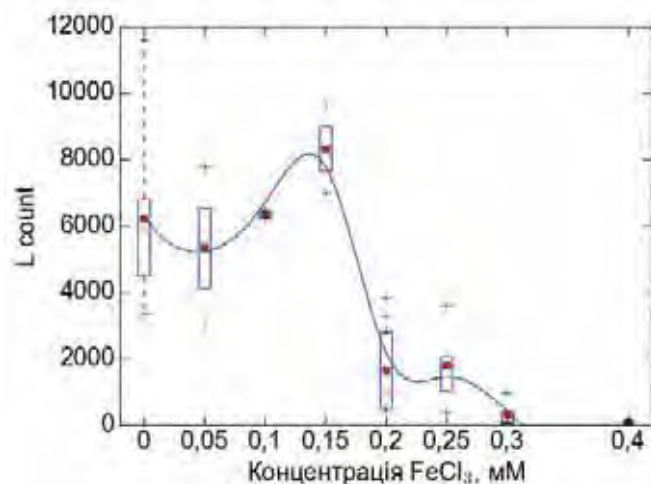


Рисунок 4.15. Кількість сегментів зигзагоподібних патернів при додаванні FeCl_3 до розчину БСА. Позначення елементів коробкового графіка див. у додатку 2.

Можливо, це пов'язано зі зміною заряду і розміру частинок БСА, які впливають на динаміку агрегації частинок у структури на поверхні субстрату; це може призвести до підвищення полідисперсності частинок БСА та погіршення кристалізації [177, 179, 180]. Але оскільки гідроксид заліза також утворює колоїдні частинки, полідисперсність частинок у розчині та погіршення кристалізації не обов'язково пов'язані з агрегацією білка.

4.5 Вплив Al^{3+} на БСА та характеристики зигзагоподібних патернів

AlCl_3 є відомим коагулянтom і використовується, зокрема, для очищення стічних вод від органічної речовини та колоїдних частинок [202]; водночас, Al^{3+} не має відомої біологічної ролі, але призводить до хронічного отруєння при накопиченні в організмі [206].

Щоб оцінити вплив AlCl_3 на текстури, було отримано плівки з розчинів БСА і AlCl_3 [13]. Для концентрацій, що використовувалися в експерименті,

кількість алюмінію, зв'язаного з БСА, набагато менше, ніж вільних іонів алюмінію в розчині [84]. При додаванні 0,025 і 0,05 мМ AlCl_3 до розчинів БСА+NaCl ζ -потенціал БСА зменшувався на 5 мВ і 9,6 мВ відносно контролю, відповідно, і при 0,4 мМ AlCl_3 змінював знак. Додавання AlCl_3 з концентрацією 0,025, 0,05 і 0,4 мМ призводить до збільшення розміру частинок білка на 2-3 нм, однак у розчинах з 0,1-0,3 мМ AlCl_3 спостерігались ознаки агрегації та седиментації БСА (у цьому діапазоні концентрацій AlCl_3 ζ -потенціал близький до нуля, що сприяє агрегації молекул білка). Додавання 0,025 і 0,05 мМ AlCl_3 також призводить до збільшення інтенсивності флуоресценції БСА на 10-30% (рис. 4.16), що може бути обумовлено структурними змінами білка при зміні рН розчину внаслідок гідролізу AlCl_3 .

З іншого боку, кількість сегментів зигзагоподібних патернів (рис. 4.17) до 0,2 мМ AlCl_3 знаходиться у межах значень контролю, і знижується починаючи з 0,4 мМ AlCl_3 . Можна припустити, що ступінь агрегації при 0,1-0,3 мМ AlCl_3 не є достатньо значною для порушення умов кристалізації.

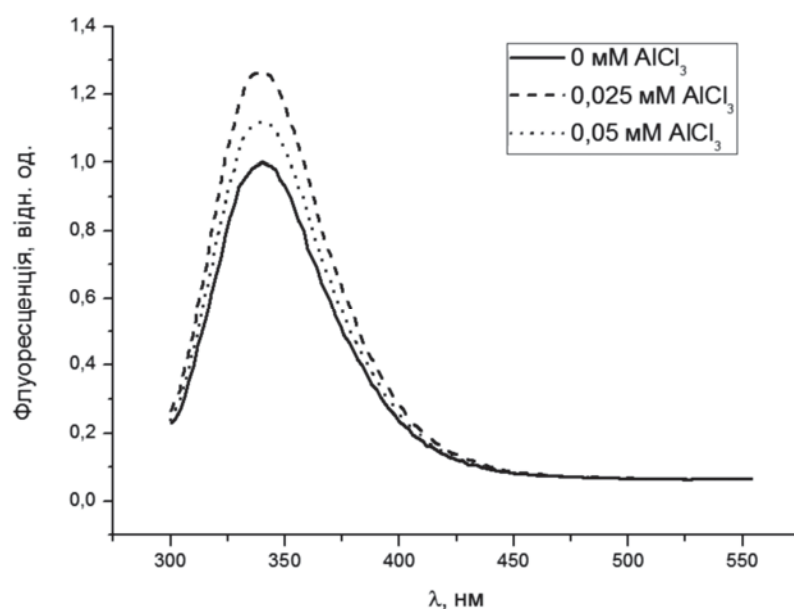


Рисунок 4.16. Спектр флуоресценції розчину БСА при додаванні AlCl_3 .

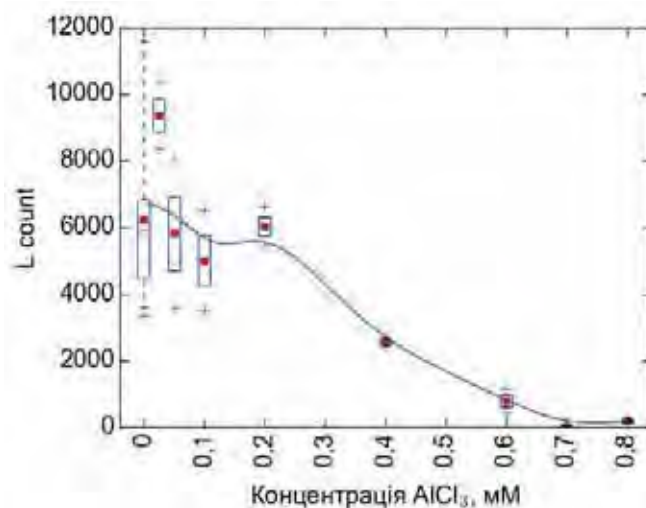


Рисунок 4.17. Кількість сегментів зигзагів при додаванні AlCl_3 до розчину БСА.

4.6 Вплив флавінмононуклеотиду на текстури плівок БСА

Вітамін В2 (рибофлавін) входить до складу багатьох окисно-відновних ферментів і бере участь в процесах перенесення водню. В біофізичних дослідженнях флавінмононуклеотид (ФМН) часто використовують як модель вітаміну В2, оскільки, на відміну від рибофлавіну, він добре розчинний у воді (де, в залежності від умов, може існувати у формі мономерів, димерів та n-мерів [207]).

Вплив ФМН на БСА в розчині був вивчений за допомогою вимірювань діелектричної проникності [11]. Плівки і спектри були отримані для концентрації 0,5 мг/мл БСА, 20 мМ NaCl і від 0,01 до 0,3 мМ ФМН. Діелектричні вимірювання проводилися при концентраціях 5 мг/мл БСА, 200 мМ NaCl і 30 мМ ФМН.

Згідно з результатами НВЧ-діелектрометрії, діелектрична проникність ϵ' розчину БСА + NaCl + ФМН виявилася нижче очікуваного для адитивного внеску значення. Це можна пояснити тим фактом, що при додаванні БСА до розчину ФМН відбувається додаткове зв'язування води – швидше за все, внаслідок змін структури білка, які зробили доступними для води додаткові ділянки БСА.

Додавання 0,01 мМ ФМН не виводить характеристики зигзагоподібних патернів за діапазон контрольних значень [6]. Однак, починаючи з 0,03 мМ,

кількість сегментів та розкид довжин сегментів зменшуються (рис. 4.18). Середня довжина сегментів (L_{mean}) та кути між сегментами (θ_{mean}) практично не змінюються.

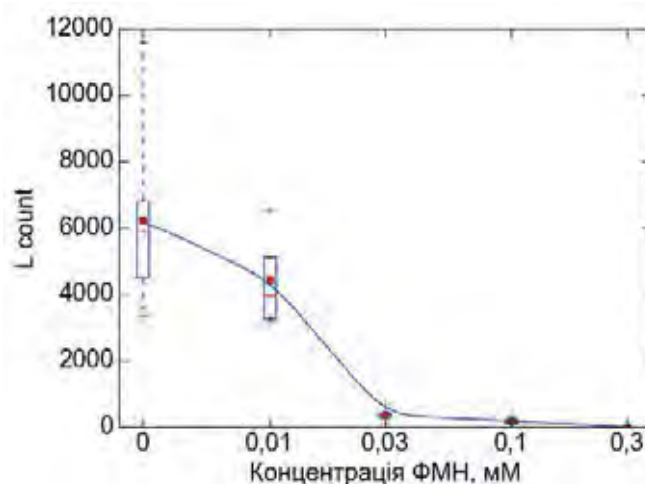


Рисунок 4.18. Кількість сегментів зигзагів при додаванні флавінмононуклеотиду до розчину БСА. Позначення елементів коробкового графіка див. у додатку 2.

Згідно з дослідженнями [97, 208, 209], САЛ та БСА утворюють комплекси з рибофлавіном (РФ), флавінаденіндинуклеотидом (ФАД) та ФМН у співвідношенні 1:1 і з високими константами зв'язування; в [209] також було показано, що за наявності РФ, конформація БСА змінюється і його гідратація зростає. У нашому випадку при 0,01 мМ ФМН кількість молекул ФМН в 1,3 рази перевищує кількість молекул БСА, а при 0,03 мМ – в 4 рази. Відомо також, що ФМН має значну тенденцію до стекінгу [210], і при випаровуванні води концентрація ФМН буде сягати значень, достатніх для утворення димерів, тримерів та більш складних асоціатів. Можна припустити, що умови формування зигзагоподібних патернів порушуються за наявності вільного ФМН, а не при зв'язуванні ФМН з БСА; скоріше за все, це пов'язано з більш високим ступенем полідисперсності частинок у розчині, що перешкоджає процесам кристалізації.

Висновки до розділу 4

1. Встановлено, що дестабілізація або пошкодження ДНК перешкоджає формуванню зигзагоподібних кристалічних структур на плівці, але не перешкоджає утворенню нерегулярних і фрактальних структур за агрегаційним механізмом.

2. Показано, що агрегація частинок БСА, викликана нейтралізацією поверхневого потенціалу білка іонами металів, заважає утворенню зигзагоподібних патернів.

3. Показано, що продукти гідролізу солі можуть заважати формуванню зигзагоподібних структур незалежно від коагуляції самого біополімеру.

4. Низькомолекулярні органічні сполуки порушують умови формування зигзагоподібних патернів тільки при надмірній кількості цих сполук, не зв'язаних з білком.

Результати досліджень даного розділу наведено в публікаціях здобувача: [4], [5], [6], [12], [13], [15], [18].

РОЗДІЛ 5

ВПЛИВ ТЕМПЕРАТУРИ І γ -РАДІАЦІЇ НА СТРУКТУРНИЙ СТАН БІОПОЛІМЕРІВ ТА ТЕКСТУРИ ЇХНІХ ПЛІВОК

Вплив фізичних чинників, таких, як температурна або радіаційна обробка розчину, полягає саме в зміні властивостей та структури біополімеру, і дозволяє віднести зміни у текстурах до конкретних процесів – денатурація, фрагментація, агрегація. Дослідження впливу цих чинників дасть змогу виявити, як безпосередньо стан біополімеру позначається на формуванні текстур.

5.1 Вплив термічної денатурації БСА на текстури плівок

Щоб з'ясувати, як термічна денатурація білка впливає на формування зигзагоподібних патернів, було отримано плівки з розчинів БСА з NaCl, витриманих при температурі 45, 70 та 95 °C протягом 10-15 хвилин [1, 6]. Мікрофотографії типових текстур для контролю (20 °C), 70 та 95 °C наведені на рис. 5.1 (а), (б), (в), відповідно.

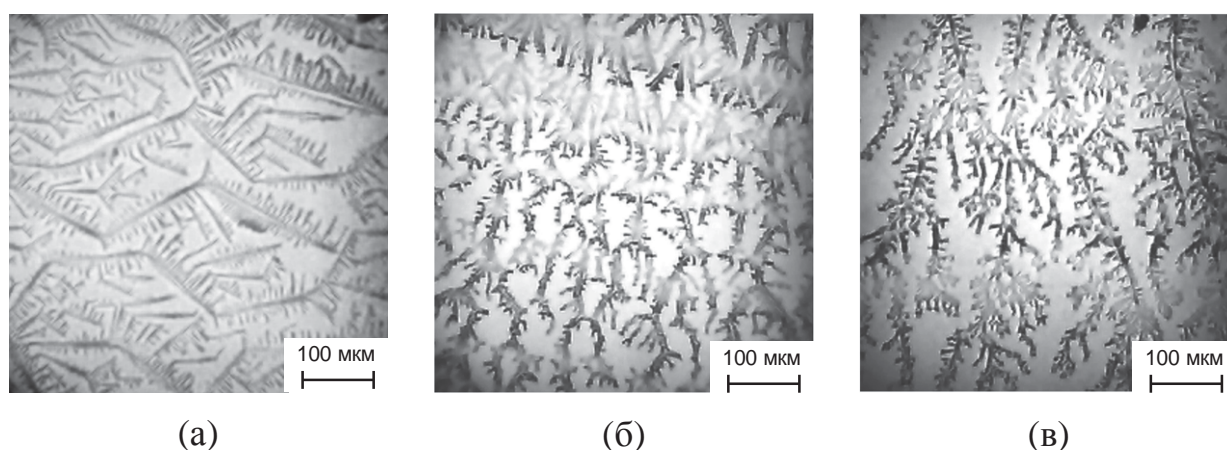
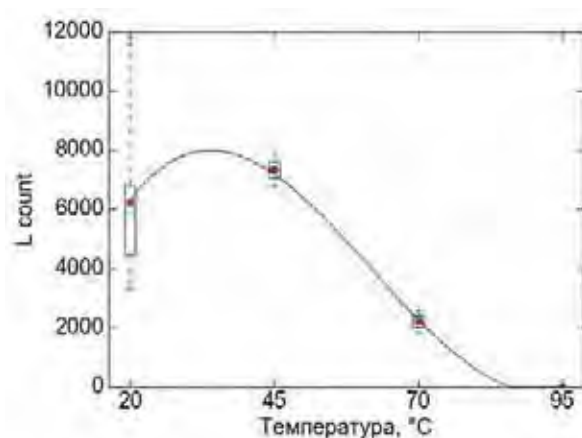


Рисунок 5.1. Текстури плівок, отриманих з розчинів БСА, нагрітих до температур: (а) 20 °C; (б) 70 °C; (в) 95 °C.

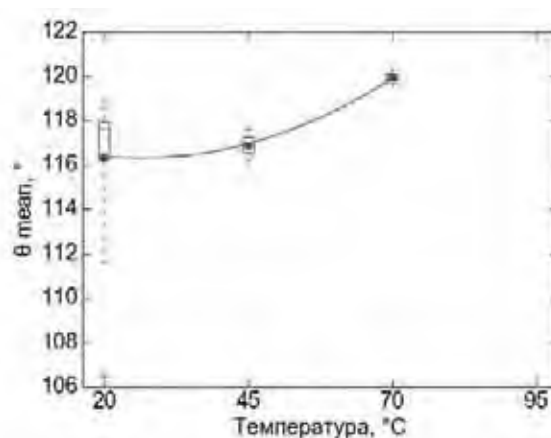
Значення L_{count} (рис. 5.2, а) і L_{sum} для 20 та 45 °C знаходяться в одному і тому ж діапазоні, при 70 °C вони значно зменшуються, а при 95 °C зигзаги не

утворюються. Значення θ_{mean} для 20 та 45 °C знаходяться в одному діапазоні, а при 70 °C вони збільшуються (рис. 5.2, б). L_{mean} практично не змінюється при різних температурах (рис. 5.2, в). При 70 °C параметр $\text{Burr}^{\text{XII}} \text{ C}$ (рис. 5.2, г) зменшується в порівнянні з 20 та 45 °C (зменшення $\text{Burr}^{\text{XII}} \text{ C}$ відповідає "розтягуванню" розподілу і зміщенню у бік більших значень).

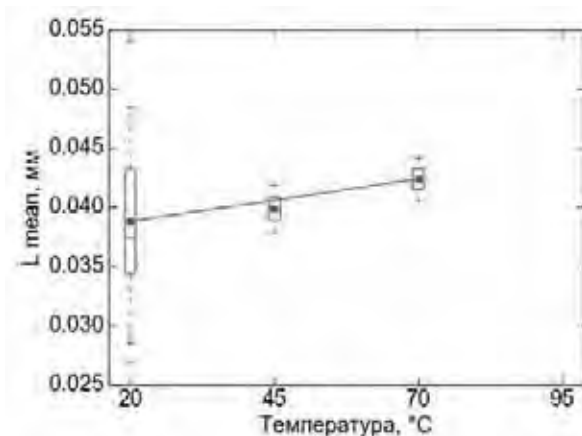
З іншого боку, фрактальна розмірність текстур (рис. 5.3) знижується при 45 °C і вище не виходить за межі довірчого інтервалу, що, імовірно, пов'язано з іншими текстурами, присутніми на поверхні плівки крім Z-патернів.



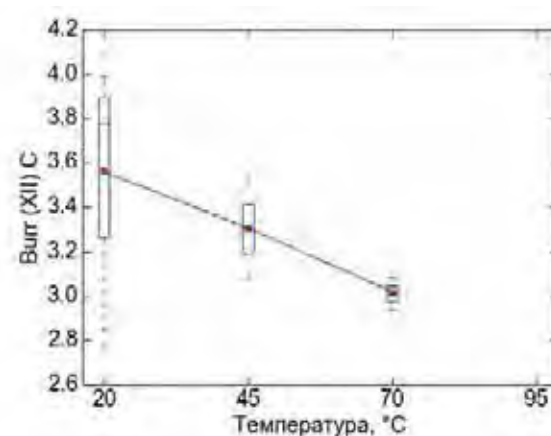
(а)



(б)



(в)



(г)

Рисунок 5.2. Характеристики патернів плівок, отриманих після температурної обробки розчину БСА: (а) кількість сегментів зигзагів; (б) середній кут між сегментами зигзагів; (в) середня довжина сегментів зигзагів; (г) параметр форми С розподілу Burr^{XII} . Позначення елементів коробкового графіка див. у додатку 2.

Інтенсивність флуоресценції БСА при $\lambda = 345$ нм, як відомо, гаситься в результаті теплової денатурації [211] і гамма-опромінення [212]. Розчини, розігріті до 70 °С і 95 °С, мають відповідно на 28% і 35% нижчу інтенсивність флуоресценції, ніж не розігріті розчини.

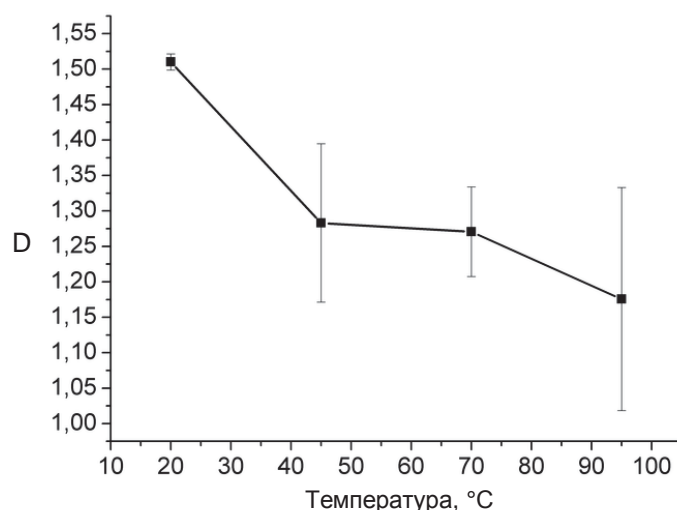


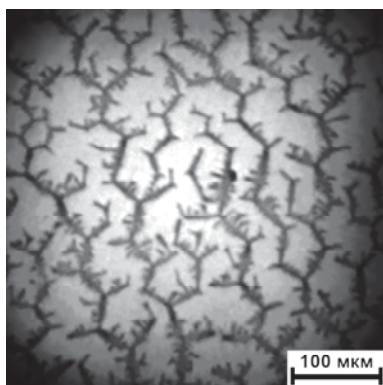
Рисунок 5.3. Фрактальна розмірність текстур плівок, отриманих після температурної обробки розчину БСА.

При 60 °С БСА починає розгортатися і утворювати первинні агрегати, при 70 °С утворює первинні та вторинні агрегати, а при 80 °С утворює агрегати великих розмірів [99, 213, 214]. Оскільки при 70 °С кількість зигзагів помітно зменшується, і при 95 °С вони повністю відсутні, можна однозначно стверджувати, що агрегація білка порушує умови формування зигзагоподібних патернів. Водночас, середня довжина L_{mean} залишається практично однаковою. Ці спостереження дозволяють припустити, що стан біополімеру в основному впливає на кількість сегментів зигзагів, тоді як зміна складу розчину також може впливати на довжину сегментів (наприклад, при зміні концентрації хлору або додаванні Al^{3+}).

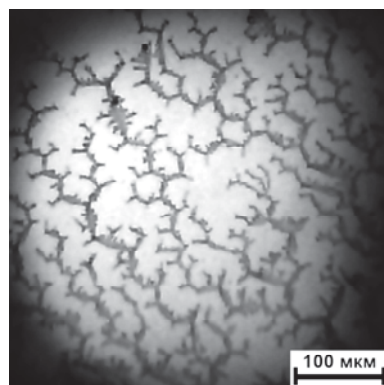
5.2 Вплив гамма-опромінення БСА на текстури плівок

Протеїнові макромолекули – це складні структури з численними групами, які можуть бути модифіковані під впливом іонізуючого випромінювання, та є біологічними об'єктами з високою радіаційною чутливістю [100]. Оскільки опромінення білкового розчину призводить до змін у структурі білкових молекул [101-103], це повинно впливати на формування текстури плівки.

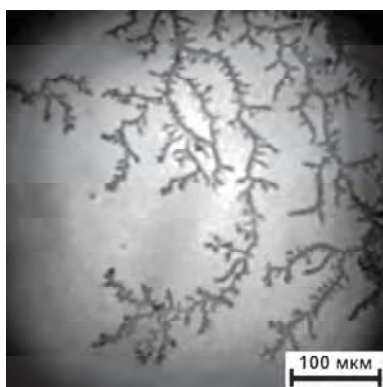
Розчини БСА опромінювалися [2, 10] при кімнатній температурі в екранованому обладнанні "Дослідник" (MRX-γ-100, СРСР) з використанням кобальту як джерела гамма-випромінювання (радіоізотоп Co^{60}). Для кожної з цільових доз пробірку з розчином поміщали всередину обладнання для опромінення протягом часу, пропорційного дозі. На рис. 5.4 показані фотографії текстур на плівках з і без Z-структур, отриманих з неопроміненого та опроміненого розчинів.



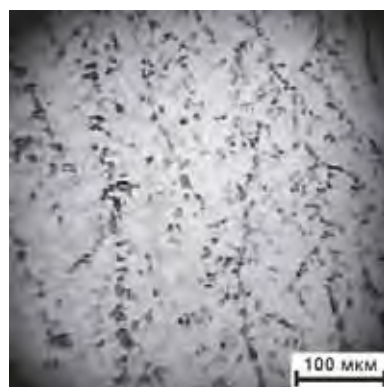
(а)



(б)



(в)



(г)

Рисунок 5.4. Типові текстури плівок БСА, отримані з розчинів: (а) неопроміненого та опромінених: (б) 200 Гр; (в) 2 кГр; (г) 12 кГр.

Порівняно з рис. 5.1а, вигляд структур на рис. 5.4а і 5.4б відрізняється, але теж знаходиться у межах варіативності для плівок нативного БСА: вигляд патернів на рис. 5.1а більш характерний для периферійної частини плівки, а на рис. 5.4а і 5.4б – для частини між центром та краями.

Рис. 5.5 ілюструє розподіл $L_{specific}$ на всій поверхні плівок, отриманих з розчинів нативного і опроміненого (12 кГр) БСА. Вісі X і Y відповідають декартовим координатам на плівці, а вісь Z – значенням $L_{specific}$ (з інтерполяцією вихідного масиву 10x10). Як видно з рис. 5.5а, у випадку контрольних розчинів максимальна щільність Z-структур спостерігається в межах 3–7 мм від краю кювети, тоді як в центральній частині кювети Z-структури майже відсутні. Натомість, для опромінених розчинів (рис. 5.5б) щільність Z-структур є практично нульовою на усій поверхні плівки.

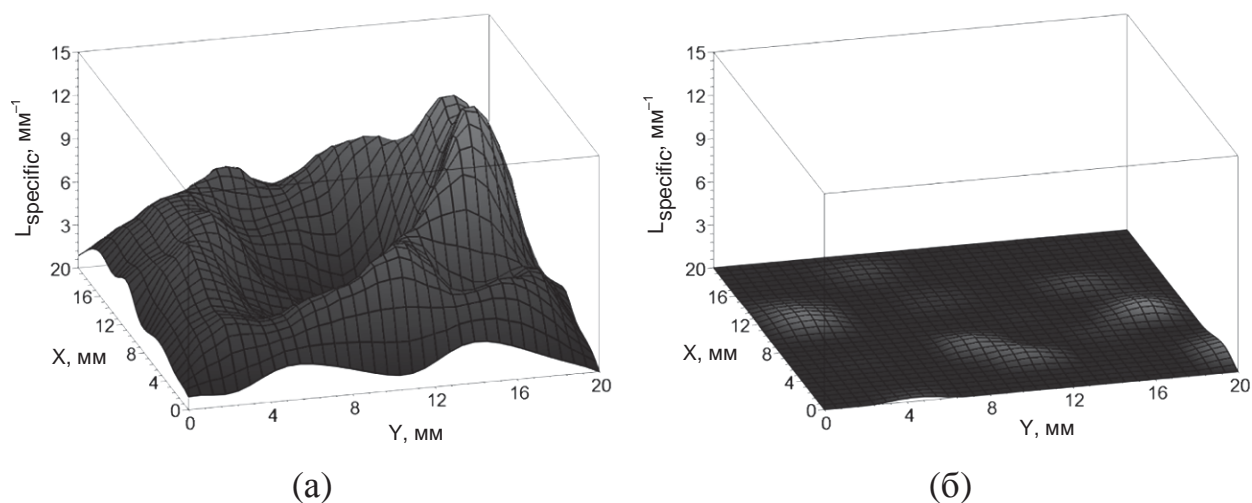


Рисунок 5.5. Розподіл питомої щільності Z-структур ($L_{specific}$) на плівках, отриманих з: (а) неопромінених (контроль) білкових розчинів; (б) опромінених (12 кГр) білкових розчинів.

Ефекти, описані вище, можуть бути обумовлені зміною структури БСА, що індукована іонізуючим випромінюванням, про що свідчить зміна спектрів поглинання і флуоресценції розчинів (рис. 5.6 а та 5.6 б). З них видно, що при дозах до 200 Гр інтенсивність флуоресценції знижується незначно. При

подальшому збільшенні дози іонізуючого випромінювання до 2 кГр інтенсивність флуоресценції істотно зменшується, а поглинання при 280 нм збільшується (рис. 5.6). При дозі опромінення 12 кГр флуоресценція практично відсутня. Це вказує на руйнування структури БСА при цій дозі.

Щоб визначити вплив фрагментації або агрегації при різних дозах на БСА, були проведені вимірювання розмірів нативного та опроміненого БСА (табл. 5.1). До 200 Гр діаметр частинок залишається тим самим і трохи збільшується при 2 кГр. При дозі 12 кГр розчин стає надто полідисперсним для ДРС-аналізу, що свідчить про подальшу агрегацію.

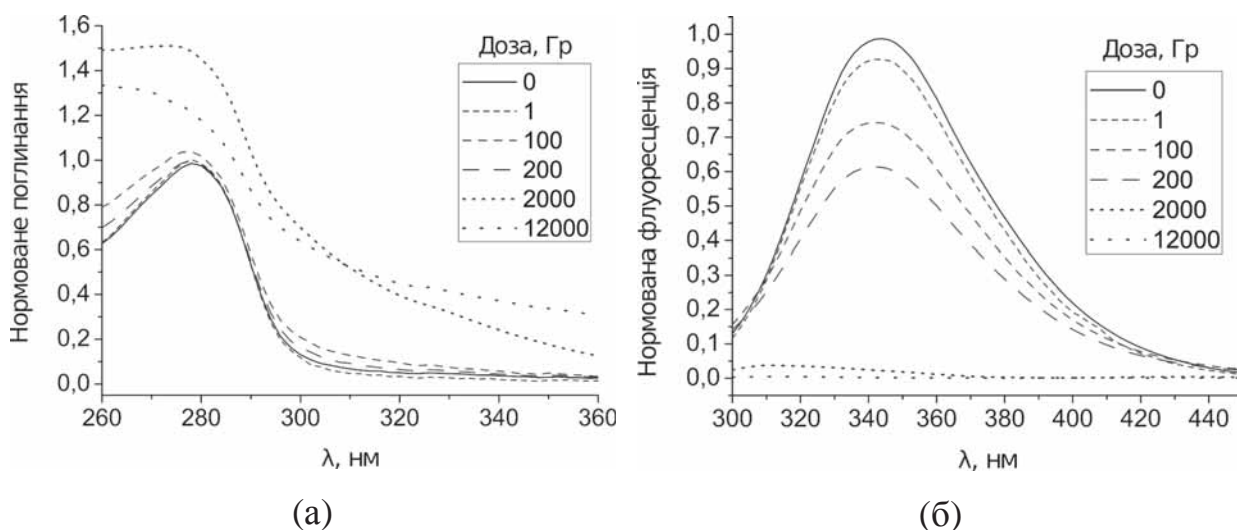


Рисунок 5.6. Спектри розчинів БСА при різних дозах опромінення: (а) поглинання; (б) флуоресценція. Розчини, які використовуються для приготування плівки (0,5 мг/мл БСА та 20 мМ NaCl), були застосовані без розведення для вимірювання спектрів.

Таблиця 5.1.

Діаметри частинок БСА (вимірювані методом динамічного розсіювання світла) в розчині 0,5 мг/мл БСА + 20 мМ NaCl. Кожне значення є усередненням 5 вимірів \pm стандартне відхилення.

Доза, Гр	0	1	100	200	2000	12000
Діаметер, нм	8 ± 2	9 ± 3	9 ± 3	9 ± 3	13 ± 4	—

Невелике зниження інтенсивності флуоресценції при дозах до 200 Гр вказує на те, що структура глобули БСА змінюється в результаті гамма-опромінення. При дозах 100 і 200 Гр структурні зміни впливають на локальне навколишнє середовище навколо амінокислотних залишків триптофану, що призводить до гасіння флуоресценції. Аналогічне зниження інтенсивності флуоресценції БСА у водному розчині спостерігалось в роботі [101] при дозах опромінення від 0,5 до 5 кГр.

Характер спостережуваних структурних змін БСА у водних розчинах, викликаних опроміненням до 200 Гр, можна пояснити результатами, отриманими у роботах Горобченко О.А. за допомогою ЕПР-спектроскопії [215] і НВЧ-діелектрометрії [216]. У цих роботах було встановлено, що при дозі 100 Гр збільшується гідратація БСА, що може бути пов'язано з розпушенням структури білка внаслідок розриву поліпептидних ланцюгів на поверхні макромолекули. При більш високих дозах (150 та 200 Гр) спостерігалось зменшення гідратації, а також гальмування спінової мітки на поверхні БСА. В діапазоні доз (25-200 Гр), вивчених методом спінових міток, не відбувалось ніяких змін в області сильно загальмованої мітки (розташованої в гідрофобній кишені). За даними електрофорезу SDS-PAGE, профіль БСА, опроміненого дозою 200 Гр, не відрізняється від профілю контролю [106], і дані ДРС показують, що діаметр частинок БСА залишається незмінним [116] (також підтверджено нашими результатами в табл. 5.1). Це вказує на те, що просторова структура БСА в основному зберігається. Це може пояснити той факт, що Z-структури формуються при дозі опромінення 200 Гр (рис. 5.5 б), хоча їх кількість зменшується у порівнянні з контрольним розчином.

За даними флуоресценції і УФ-поглинання (рис. 5.6 а, б), 2 кГр іонізуючої радіації руйнує білок, або, принаймні, локальне оточення навколо амінокислотних залишків триптофану. Дози в 1 кГр, як правило, достатньо, щоб викликати руйнування поліпептидного ланцюга БСА [101, 112, 113, 217]. При 2,5 кГр основна смуга БСА все ще видна, але значно розмазана [115], з чого можна зробити висновок, що при 2 кГр невелика кількість

неушкодженого альбуміну (66 кДа) все ще присутня [115]. Дані ДРС (табл. 5.1) також вказують на незначне збільшення розміру частинок БСА. Очевидно, це все ще дозволяє Z-структурам утворюватися (рис. 5.4 в). При дозах 5 кГр або вище фрагменти зруйнованого білка починають утворювати агрегати з великою молекулярною вагою [112], чому відповідає відсутність Z-структур при 12 кГр (рис. 5.4 г, рис. 5.5 б, рис. 5.7 а). Це підтверджує гіпотезу про те, що агрегація БСА перешкоджає формуванню зигзагоподібних патернів.

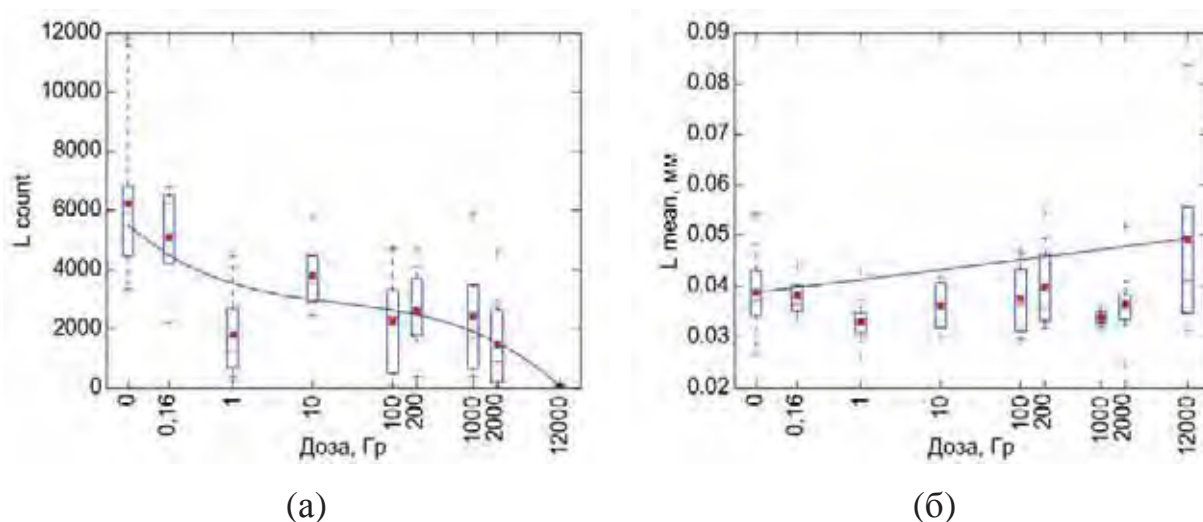


Рисунок 5.7. Характеристики патернів після гамма-опромінення розчину біополімеру: (а) кількість сегментів зигзагів; (б) середня довжина сегментів зигзагів. Позначення елементів коробкового графіка див. у додатку 2.

Іонізуюче випромінювання змінює кількість сегментів зигзагів, але середня довжина L_{mean} (рис. 5.7 б), кути (θ_{mean}) та інші параметри розподілу практично не залежать від дози. При 12 кГр (агрегація білкових фрагментів) зигзаги не утворюються, але в діапазоні доз 1 – 2000 Гр (руйнування білка) кількість зигзагів на заданій плівці може бути від майже нульової до типової для контролю. Це говорить про те, що, на відміну від утворення агрегатів, фрагментація біополімерів не має однозначного впливу на формування зигзагоподібних патернів.

У роботі [55] описані сильно розтягнуті анізотропні кластери (отримані з суспензій частинок нанозолота), які нагадують Z-структури. Беручи до уваги, що розміри сферичних наночастинок золота (3-35 нм) [57] і молекул БСА (7,5 x 6,5 x 4,0 нм) [218] мають той же порядок величини, можна припустити, що молекули БСА поведуться аналогічно до наночастинок золота під час випаровування розчину. Таким чином, формування Z-структур, швидше за все, є результатом процесу агрегації частинок в колоїдному розчині БСА на пізній стадії сушки. Оскільки тип патерну значною мірою залежить від розміру колоїдних частинок [57, 58], зміна розміру часток буде в значній мірі впливати на процеси перенесення частинок в краплі, що випаровується (радіальний потік, сила ДЛФО і рециркуляція Марангоні, які регулюють потік рідини і перенесення частинок при випаровуванні краплі [67] і які вважаються ключовими факторами при визначенні режиму формування патерну [40]).

5.3 Аналіз відмінностей між статистичними розподілами $L_{specific}$ для різних доз опромінення розчину БСА

Щоб перевірити, наскільки достовірно відрізняються розподіли значень $L_{specific}$ для контролю та для більш високих доз опромінення зразка, був проведений статистичний аналіз відмінності між відповідними вибірками [17]. Вихідні дані, які були використані при розрахунках, наведені у табл. 5.2.

Таблиця 5.2.

Значення $L_{specific}$ для відповідних плівок, отриманих з контрольних та опромінених розчинів біополімерів.

Доза, Гр	$L_{specific}$, мм ⁻¹	Доза, Гр	$L_{specific}$, мм ⁻¹	Доза, Гр	$L_{specific}$, мм ⁻¹
0	3,20	1	0,18	200	0,32
0	3,34	1	0,27	200	1,21
0	3,50	1	0,35	200	2,04
0	3,69	1	0,56	200	2,13
0	4,01	1	0,94	200	5,37

Доза, Гр	$L_{\text{specific}}, \text{мм}^{-1}$	Доза, Гр	$L_{\text{specific}}, \text{мм}^{-1}$	Доза, Гр	$L_{\text{specific}}, \text{мм}^{-1}$
0	4,19	1	1,04	200	5,64
0	4,22	1	1,23	1000	0,34
0	4,53	1	1,42	1000	0,58
0	4,82	1	1,62	1000	2,26
0	5,08	1	2,38	1000	5,06
0	6,60	1	3,40	2000	0,02
0	6,88	1	4,04	2000	0,04
0	7,00	10	1,79	2000	0,12
0	7,06	10	3,06	2000	0,23
0	7,98	10	3,95	2000	0,46
0	8,01	10	4,56	2000	0,79
0	8,74	100	0,05	2000	2,27
0	10,55	100	0,36	2000	2,34
0,16	2,34	100	0,38	2000	2,77
0,16	5,47	100	2,18	2000	4,02
0,16	5,61	100	2,50	12000	0,00
		100	3,22	12000	0,04
		100	4,37	12000	0,06
		100	4,79	12000	0,11

Приблизну функцію розподілу ймовірності значень L_{specific} можна спробувати оцінити за допомогою ядрової оцінки густини розподілу (5.1) [219]

$$f_h(x) = \frac{1}{nh} \sum_{i=1}^n K\left(\frac{x-x_i}{h}\right), \quad (5.1)$$

де K – статистичне ядро (функція, інтеграл якої дорівнює одиниці), h – параметр згладжування, n – кількість елементів вибірки, x_i – i -й елемент вибірки. Якщо припустити одномодальний розподіл, значення h можна оцінити за формулою (5.2) [219]

$$h = \left(\frac{4}{3n} \right)^{\frac{1}{5}} \sigma, \quad (5.2)$$

де σ – стандартне відхилення даних.

Отримана з використанням Гаусівського ядра емпірична функція густини ймовірності $L_{specific}$ для неопромінених зразків наведена на рис. 5.8. Цей розподіл не можна віднести до будь-якої з відомих статистичних функцій, тому для аналізу даних табл. 5.2 були застосовані непараметричні методи.

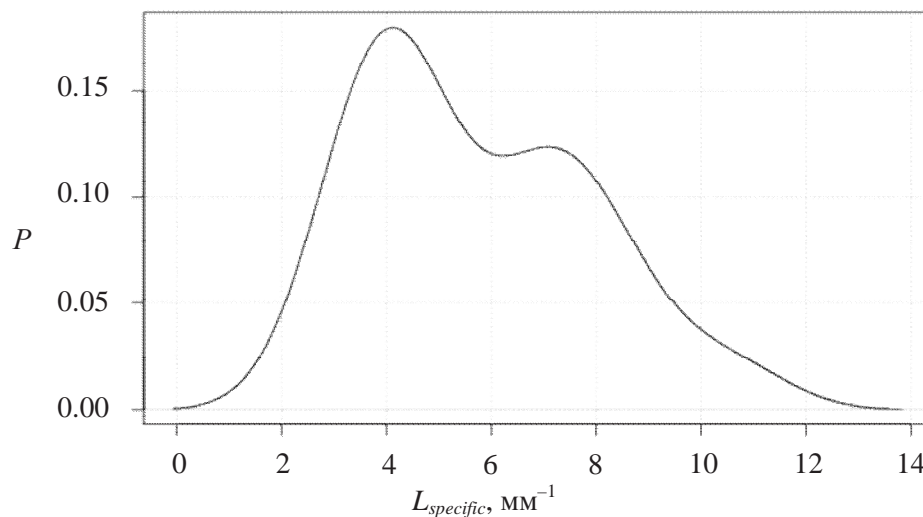


Рисунок 5.8. Оцінка густини розподілу величини $L_{specific}$ для дози 0 Гр; P – густина ймовірності.

В даному випадку ми бажаємо оцінити різницю між парами незалежних вибірок, які можуть містити різну кількість елементів. Для визначення того, чи є розподіли вибірок достовірно відмінними, було використано тест Крускала-Уолліса [220], U-критерій Манна-Уїтні [221] та тест Коновера-Імана [222].

Тест Крускала-Уолліса виконується таким чином.

1. Складення з усіх груп (вибірок) єдиного ряду, відсортованого у порядку збільшення залежної величини;

2. Призначення кожному елементу ряду значення рангу (порядковий номер елемента у ряді); якщо декілька елементів мають однакове значення залежної величини, за їхній ранг береться середнє значення усіх відповідних порядкових номерів;
3. Розрахунок Н-статистики за формулою

$$H = \frac{1}{S^2} \left(\sum_{i=1}^k \frac{R_i^2}{n_i} - N \frac{(N+1)^2}{4} \right),$$

$$S^2 = \frac{1}{N-1} \left(\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} R_{ij}^2 - N \frac{(N+1)^2}{4} \right),$$
(5.3)

де N – сумарна кількість елементів в усіх групах, k – кількість груп, n_i – кількість елементів у i -й групі, R_i – сума рангів елементів i -ї групи, R_{ij} – ранг j -го елемента в i -й групі, H – сума квадратів стандартних відхилень випадкових величин від середнього значення їхньої популяції, S – дисперсія рівномірного розподілу по перших N цілих чисел.

Отримане значення H порівнюється з табличним значенням розподілу χ^2 для рівня значущості α та $k - 1$ ступенів свободи. Якщо H перевищує табличне значення, це свідчить, що, принаймні, між однією парою вибірок є достовірна відмінність.

Результат ранжування вихідних даних наведений у табл. 5.3. Відповідне значення H складає 39,13; для кількості груп $k = 9$ та рівня значущості $\alpha = 0,05$ значення χ^2 становить 2,73, тобто, принаймні, деякі з доз достовірно відрізняються між собою.

Таблиця 5.3.

Ранги для сукупності усіх значень $L_{specific}$.

$L_{specific}$ (Доза)	Ранг	$L_{specific}$ (Доза)	Ранг	$L_{specific}$ (Доза)	Ранг
0 (12000 Гр)	1	1,23 (1 Гр)	24	4,02 (2000 Гр)	47
0,02 (2000 Гр)	2	1,42 (1 Гр)	25	4,04 (1 Гр)	48

L_{specific} (Доза)	Ранг	L_{specific} (Доза)	Ранг	L_{specific} (Доза)	Ранг
0,04 (2000 Гр)	3,5	1,62 (1 Гр)	26	4,19 (0 Гр)	49
0,04 (12000 Гр)	3,5	1,79 (10 Гр)	27	4,22 (0 Гр)	50
0,05 (100 Гр)	5	2,04 (200 Гр)	28	4,37 (100 Гр)	51
0,06 (12000 Гр)	6	2,13 (200 Гр)	29	4,53 (0 Гр)	52
0,11 (12000 Гр)	7	2,18 (100 Гр)	30	4,56 (10 Гр)	53
0,12 (2000 Гр)	8	2,26 (1000 Гр)	31	4,79 (100 Гр)	54
0,18 (1 Гр)	9	2,27 (2000 Гр)	32	4,82 (0 Гр)	55
0,23 (2000 Гр)	10	2,34 (0,16 Гр)	33,5	5,06 (1000 Гр)	56
0,27 (1 Гр)	11	2,34 (2000 Гр)	33,5	5,08 (0 Гр)	57
0,32 (200 Гр)	12	2,38 (1 Гр)	35	5,37 (200 Гр)	58
0,34 (1000 Гр)	13	2,5 (100 Гр)	36	5,47 (0,16 Гр)	59
0,35 (1 Гр)	14	2,77 (2000 Гр)	37	5,61 (0,16 Гр)	60
0,36 (100 Гр)	15	3,06 (10 Гр)	38	5,64 (200 Гр)	61
0,38 (100 Гр)	16	3,2 (0 Гр)	39	6,6 (0 Гр)	62
0,46 (2000 Гр)	17	3,22 (100 Гр)	40	6,88 (0 Гр)	63
0,56 (1 Гр)	18	3,34 (0 Гр)	41	7 (0 Гр)	64
0,58 (1000 Гр)	19	3,4 (1 Гр)	42	7,06 (0 Гр)	65
0,79 (2000 Гр)	20	3,5 (0 Гр)	43	7,98 (0 Гр)	66
0,94 (1 Гр)	21	3,69 (0 Гр)	44	8,01 (0 Гр)	67
1,04 (1 Гр)	22	3,95 (10 Гр)	45	8,74 (0 Гр)	68
1,21 (200 Гр)	23	4,01 (0 Гр)	46	10,55 (0 Гр)	69

Відхилення нульової гіпотези у тесті Крускала-Уолліса дозволяє застосувати додаткові методи для виявлення того, які конкретно дози достовірно відрізняються між собою.

Обчислення U-критерію Манна-Уїтні для пари вибірок виконується таким чином.

1. Складення єдиного ряду з обох вибірок та його ранжування (за тим самим принципом, що був використаний у методі Крускала-Уолліса);

2. Підрахування суми рангів R_1 для елементів з першої вибірки та R_2 для елементів з другої вибірки;
3. Розрахунок значень критеріїв U_1 та U_2 за формулою

$$U_{1,2} = R_{1,2} - \frac{n_{1,2} \cdot (n_{1,2} + 1)}{2}, \quad (5.4)$$

де n_1 – кількість елементів у першій вибірці, n_2 – кількість елементів у другій вибірці.

Чим більше відрізняються U_1 та U_2 , тим менша вірогідність, що вибірки були отримані з єдиного розподілу. Чисельно ступінь статистичної значущості цієї відмінності можна виразити через р-значення, яке в даному випадку відповідає частці можливих розподілів рангів між вибірками, які б дали таку ж саму або більшу різницю між U_1 та U_2 . Оскільки обчислення цих розподілів комбінаторно ускладнюється з ростом кількості елементів у вибірках, для середніх та великих розмірів вибірок р-значення можна знайти з таблиці стандартного нормального розподілу (Z-таблиці) за величиною Z

$$Z = \frac{\max(U_1, U_2) - (n_1 n_2 / 2)}{\sqrt{n_1 n_2 (n_1 + n_2 + 1) / 12}}. \quad (5.5)$$

Беручи до уваги, що розподіли значень $L_{specific}$ для проміжних доз не можуть бути вище розподілу контролю (0 Гр) або нижче розподілу для максимальної дози (12000 Гр), при порівнянні 0 Гр або 12000 Гр з іншими дозами був використаний односторонній тест, а у всіх інших випадках застосовувався двохсторонній тест (з подвоєним р-значенням).

Щоб врахувати збільшену ймовірність похибки першого роду при проведенні множинних порівнянь, достовірність відмінності між вибірками оцінювалася з використанням методу Холма-Бонфероні [223]. Для цього порівнювані пари сортуються в порядку зростання р-значення, і рівень значущості α'_i для кожної пари розраховується за формулою

$$\alpha'_r = \frac{\alpha}{n - r + 1}, \quad (5.6)$$

де α – вихідний рівень значущості (0,05 в даному випадку), n – загальна кількість порівнянь, r – ранг відповідної пари. Після цього знаходиться пара з найменшим рангом, для якої р-значення перевищує відповідне значення α' ; значущою вважається тільки відмінність між всіма попередніми парами. Як можна бачити з табл. 5.4, ця умова виконується тільки при порівнянні контролю з дозами 1 Гр, 2000 Гр, 100 Гр та 12000 Гр.

Таблиця 5.4.

Р-значення тестів Манна-Уїтні (з врахуванням односторонності чи двохсторонності тесту) для відповідних пар вибірок та рівні значущості α' , розраховані за методом Холма-Бонфероні.

Пара	р	Ранг	α'_r	Пара	р	Ранг	α'_r
0 : 1	0,0000	1	0,0014	0,16 : 1000	0,0771	19	0,0028
0 : 2000	0,0000	2	0,0014	0,16 : 100	0,1025	20	0,0029
0 : 100	0,0009	3	0,0015	1 : 200	0,1898	21	0,0031
0 : 12000	0,0011	4	0,0015	200 : 2000	0,1931	22	0,0033
1 : 12000	0,0018	5	0,0016	0,16 : 200	0,1967	23	0,0036
200 : 12000	0,0053	6	0,0016	0 : 0,16	0,2409	24	0,0038
100 : 12000	0,0087	7	0,0017	100 : 2000	0,2481	25	0,0042
10 : 12000	0,0105	8	0,0017	0,16 : 10	0,2888	26	0,0045
1000 : 12000	0,0105	9	0,0018	10 : 1000	0,3865	27	0,0050
0 : 1000	0,0108	10	0,0019	1 : 2000	0,3913	28	0,0056
0 : 200	0,0117	11	0,0019	10 : 100	0,3958	29	0,0063
0,16 : 12000	0,0169	12	0,0020	1 : 100	0,3961	30	0,0071
2000 : 12000	0,0202	13	0,0021	1000 : 2000	0,4795	31	0,0083
0 : 10	0,0205	14	0,0022	10 : 200	0,6698	32	0,0100
1 : 10	0,0291	15	0,0023	200 : 1000	0,6698	33	0,0125

Пара	p	Ранг	α'_r
0,16 : 1	0,0304	16	0,0024
0,16 : 2000	0,0346	17	0,0025
10 : 2000	0,0477	18	0,0026

Пара	p	Ранг	α'_r
1 : 1000	0,7160	34	0,0167
100 : 200	0,7963	35	0,0250
100 : 1000	1,0000	36	0,0500

Тест Коновера-Імана базується на результатах обчислень тесту Крускала-Уолліса. Згідно з ним, дві пари вибірок вважаються достовірно відмінними, якщо виконується умова

$$\left| \frac{R_{i1}}{n_{i1}} - \frac{R_{i2}}{n_{i2}} \right| > t_{\alpha/2} \cdot \sqrt{S^2 \frac{N-1-H}{N-k} \left(\frac{1}{n_{i1}} + \frac{1}{n_{i2}} \right)}, \quad (5.7)$$

де R_{i1} , n_{i1} – сума рангів та кількість елементів у $i1$ -й групі, R_{i2} , n_{i2} – сума рангів та кількість елементів у $i2$ -й групі, $t_{\alpha/2}$ – табличне значення розподілу Стьюдента для рівня значущості $\alpha/2$ та $N - k$ ступенів свободи.

Результати розрахунків тесту Коновера-Імана наведені у табл. 5.5. Згідно з отриманими результатами, при рівні значущості $\alpha = 0,05$ контроль відрізняється від 1, 100, 200, 1000, 2000 і 12000 Гр; 0,16 Гр також відрізняється від 1, 2000 і 12000 Гр, 12000 Гр відрізняється від 1, 10, 100, 200 і 1000 Гр, та 10 Гр відрізняється від 2000 Гр.

Таблиця 5.5.

Значення лівої (ЛЧН) та правої (ПЧН) частин нерівності Коновера-Імана (5.7) для відповідних пар вибірок.

Пара	ЛЧН	ПЧН
0 : 12000	51,2	17,9
0 : 2000	34,6	12,8
0 : 1	31,0	12,1
12000 : 0,16	46,5	24,7
0 : 100	24,7	13,7

Пара	ЛЧН	ПЧН
1000 : 0,16	21,1	24,7
200 : 2000	14,2	16,7
0 : 10	14,8	17,9
200 : 0,16	15,7	22,9
1 : 200	10,6	16,2

Пара	ЛЧН	ПЧН
10 : 12000	36,4	22,9
200 : 12000	30,8	20,9
0 : 1000	25,8	17,9
2000 : 0,16	29,8	21,3
100 : 12000	26,5	19,8
0 : 200	20,4	15,3
1 : 0,16	26,3	20,9
1000 : 12000	25,4	22,9
1 : 12000	20,2	18,7
10 : 2000	19,8	19,1
100 : 0,16	20,0	21,9
2000 : 12000	16,6	19,1
1 : 10	16,2	18,7

Пара	ЛЧН	ПЧН
100 : 2000	9,9	15,3
100 : 10	9,9	19,8
10 : 1000	11,0	22,9
2000 : 1000	8,8	19,1
1 : 100	6,3	14,8
10 : 0,16	10,1	24,7
1 : 1000	5,2	18,7
200 : 10	5,6	20,9
200 : 1000	5,4	20,9
1 : 2000	3,6	13,9
100 : 200	4,3	17,5
0 : 0,16	4,7	20,2
100 : 1000	1,1	19,8

Отримані результати свідчать про те, що, за впливом на кількість Z-структур на плівках, дози опромінення можна умовно поділити на 3 групи – "непошкоджена" (контроль і 0,16 Гр), "повністю зруйнована" (12000 Гр) та "проміжна" (1-2000 Гр), всередині яких вплив на $L_{specific}$ статистично не відрізняється. Якщо об'єднати відповідні вибірки, то відмінність між цими групами стає цілком чіткою (табл. 5.6 і табл. 5.7).

Таблиця 5.6.

Результати тесту Манна-Уїтні для згрупованих доз.

Пара	p	Ранг	α	Критерій
0-0,16 : 1-2000	0,0000	1	0,0167	$p < \alpha$ виконується
0-0,16 : 12000	0,0009	2	0,0250	$p < \alpha$ виконується
1-2000 : 12000	0,0013	3	0,0500	$p < \alpha$ виконується

Значення лівої (ЛЧН) та правої (ПЧН) частин нерівності Коновера-Імана (5.7) для згрупованих доз.

Пара	ЛЧН	ПЧН	Критерій
0-0,16 : 12000	50,5	18,0	ЛЧН > ПЧН виконується
0-0,16 : 1-2000	26,6	8,7	ЛЧН > ПЧН виконується
12000 : 1-2000	23,9	17,2	ЛЧН > ПЧН виконується

Дози, які входять до діапазону 1-2000 Гр, справляють якісно та кількісно різний вплив на БСА: до 5 Гр – зміна вторинної структури та поверхневого заряду [118], 100 Гр – розпушення структури білка [215, 216], 200 Гр – пошкодження 10-20% білка [106], 1000 Гр – фрагментація [101, 112, 113, 217] і пошкодження 50-60% білка [106], 2000 Гр – пошкодження практично усіх молекул білка у розчині [115]. Проте, на питому довжину зигзагів ($L_{specific}$) всі ці явища справляють статистично однаковий вплив. Це дозволяє припустити, що здатність до формування Z-патернів на плівці знижується порівняно з контролем саме завдяки процесам, які відбуваються при найменшій дозі діапазону (зміна вторинної структури та поверхневого заряду), у той час як послаблення та фрагментація структури білка при більш високих дозах не створює додаткових перешкод формуванню Z-структур.

Статистично однаковий ефект опромінення в діапазоні доз 1-2000 Гр, можливо, також вказує на те, що полідисперсність молекул білка, викликана зміною вторинної структури, залишається приблизно на тому ж рівні при фрагментації молекул білка.

З іншого боку, при дозах вище 5 кГр має місце агрегація білка [101, 109, 112-114], тому при 12 кГр Z-патерни на плівках фактично відсутні.

Таким чином, наявність достовірної відмінності між контролем, проміжною групою доз та дозою 12 кГр дозволяє встановити якісну відповідність між статистичним розподілом $L_{specific}$ і рівнем опромінення біополімеру.

5.4 Чутливість чисельних характеристик текстур до стану біополімеру

Руйнування структурного стану біополімеру відбивається на здібності розчину цього біополімеру формувати Z-структури. У табл. 5.8 і 5.9 наведене порівняння спектроскопічних показників (інтенсивність УФ поглинання A , інтенсивність флуоресценції F , зсув піку флуоресценції k), діаметру частинок d та питомої довжини зигзагів $L_{specific}$ при термічній денатурації та гамма-опроміненні бичачого сироваткового альбуміну [14].

Таблиця 5.8.

Термічна денатурація

Температура, °C	F ($\pm 10\%$)	k , cm^{-1} ($\pm 170 \text{ cm}^{-1}$)	$L_{specific}$ ($\pm 37\%$)
20–45	100%	0	100%
70	74%	431	35%
95	78%	709	0%

Таблиця 5.9.

Гамма-опромінення

Доза, Гр	A ($\pm 10\%$)	F ($\pm 10\%$)	d ($\pm 30\%$)	$L_{specific}$ ($\pm 37\%$)
0–0.16	100%	100%	100%	100%
1–200	103%	83%	110%	42%
2000	150%	4%	160%	25%
12000	122%	0%	—*	1%

* При цій дозі білковий розчин стає надто полідисперсним для ДРС-аналізу.

Зроблені в результаті проведеної роботи спостереження про вплив розглянутих факторів на ДНК або білок і на чисельні характеристики текстур можна підсумувати таким чином (табл. 5.10).

Деякі з досліджуваних речовин здатні самотійно утворювати колоїдні частинки, перешкоджаючи формуванню Z-структур без впливу на стан

біополімеру. Спостережувані зміни стану ДНК або білка полягали в дестабілізації, руйнуванні структури або агрегації частинок біополімеру під впливом галогенід-іонів, катіонів металів, а також дії температури та гамма-опромінення. Зазвичай це призводить до зменшення кількості сегментів зигзагоподібних патернів, але в деяких випадках позначається на середній довжині сегментів, площі текстур і фрактальній розмірності текстур.

Таблиця 5.10.

Дія експериментальних чинників на стан біополімеру (ДНК, білок) та на чисельні характеристики текстур (відносна площа текстур S , фрактальна розмірність текстур D , кількість сегментів зигзагів L_{count} , довжина сегментів зигзагів L_{mean}).

Спостережувані зміни стану біополімеру	Причина змін	Вплив на текстуру
--	Наявність частинок ФМН [11]	L_{count} зменшується
	Наявність частинок метагідроксиду заліза [5, 12, 15]	L_{count} зменшується D зменшується
Зміна структурного стану	γ -опромінення ~ 5 Гр (БСА) [2]	L_{count} зменшується
	Заміна Cl^- на Br^- (БСА) [1]	L_{count} зменшується
	Заміна Cl^- на F^- (БСА) [1]	L_{mean} зменшується
Руйнування вторинної структури	Додавання Ag^+ і наночастинок срібла (ДНК) [4]	S зменшується
	γ -опромінення ≥ 200 Гр (БСА) [2]	L_{count} зменшується
Агрегація	Нейтралізація заряду при додаванні Al^{3+} , Fe^{3+} (БСА) [13]	L_{count} зменшується
	Термічна денатурація (БСА) [1, 6]	L_{count} зменшується
	γ -опромінення ≥ 5000 Гр (БСА) [2]	L_{count} зменшується

Практичне значення отриманих результатів полягає в тому, що, на підставі встановлених відповідностей між складом розчину, дією домішок та фізичних впливів, зміною стану біополімеру і кількісними характеристиками текстур, можна запропонувати метод оцінки рівня нативності структури біополімеру при дії хімічних та фізичних денатуруючих чинників.

Перспективним напрямком подальших досліджень є вдосконалення контролю умов отримання плівок, автоматизація розпізнавання та чисельна характеристика інших типів патернів, що потенційно може дозволити створити метод діагностики стану біомолекул у розчині за текстурами висушених з них плівок.

Висновки до розділу 5

1. Утворення первинних і вторинних агрегатів внаслідок температурної денатурації біополімеру заважає формуванню зигзагоподібних патернів, а утворення агрегатів великих розмірів повністю припиняє формування Z-структур.

2. Агрегація фрагментів повністю зруйнованого іонізуючим опроміненням біополімеру порушує умови формування зигзагоподібних патернів.

3. Часткове пошкодження біополімеру знижує ймовірність утворення Z-структур.

4. Показано, що питома довжина та кількість сегментів зигзагів чутливі до структурного стану біополімерів.

Результати досліджень даного розділу наведено в публікаціях здобувача: [1], [2], [6], [10], [14], [17].

ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі вирішено важливу біофізичну задачу, яка полягає у встановленні зв'язку між змінами стану біополімеру (дестабілізація, порушення структури, агрегація) у водно-сольовому розчині під дією фізичних і хімічних факторів, та змінами чисельних характеристик текстур на плівках, висушених з цих розчинів. Отримані експериментальні дані наочно показують, що агрегація біополімеру є одним з основних механізмів впливу його стану на зигзагоподібні патерни, і закладають основу для розв'язання зворотної задачі – за змінами параметрів текстур оцінювати стан біополімеру і вплив на нього молекулярного оточення.

Отримані результати дозволяють сформулювати такі узагальнюючі висновки:

1. Вперше показано, що при дії хімічних чи фізичних факторів на водно-сольові розчини ДНК або білка формування текстур на плівках висушених водно-сольових розчинів біополімерів пригнічується внаслідок дестабілізації, пошкодження структури та агрегації біополімерів.

2. Вперше створена, обґрунтована і застосована програма кількісного аналізу параметрів зигзагоподібних патернів на плівках (кількість сегментів зигзагів, їх питома і середня довжина), які виявилися чутливими до фізико-хімічних впливів на біополімери у вихідному розчині.

3. Встановлено вплив катіонів та аніонів неорганічних солей на текстури плівок біополімерів. За допомогою спектроскопічних методів вперше виявлено, що для формування зигзагоподібних патернів критичним є наявність у вихідних розчинах аніонів хлору, але не є критичним тип катіонів лужних металів.

4. Вперше показано, що зміна площі, фрактальної розмірності текстур і кількості сегментів зигзагоподібних патернів відповідає зміні структурного стану або нейтралізації поверхневого потенціалу молекул ДНК і білка іонами металів (Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+}).

5. Вперше показано, що низькомолекулярна органічна сполука флавінмононуклеотид порушує умови формування зигзагоподібних патернів при концентраціях, які перевищують концентрацію біополімеру.

6. Вперше встановлено, що утворення агрегатів при тепловій денатурації бичачого сироваткового альбуміну частково або повністю перешкоджає формуванню зигзагоподібних патернів, в залежності від ступеня агрегації білка.

7. Вперше показано, що зміна структурного стану білка при гамма-опроміненні його розчинів різними дозами позначається на характеристиках зигзагоподібних патернів, насамперед, на кількості сегментів зигзагів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Glibitskiy G. M., Glibitskiy D. M., Gorobchenko O. A., Nikolov O. T., Roshal A. D., Semenov M. A., Gasan A. I. Textures on the surface of BSA films with different concentrations of sodium halides and water state in solution // *Nanoscale Res. Lett.* 2015. Vol. 10(1). Article ID 155. DOI: 10.1186/s11671-015-0860-0
2. Glibitskiy D. M., Gorobchenko O. A., Nikolov O. T., Cheipesh T. A., Roshal A. D., Zibarov A. M., Shestopalova A. V., Semenov M. A., Glibitskiy G. M. Effect of gamma-irradiation of bovine serum albumin solution on the formation of zigzag film textures // *Rad. Phys. Chem.* 2018. Vol. 144. P. 231–237. DOI: 10.1016/j.radphyschem.2017.08.019
3. Глибицкий Г. М., Семенов М. А., Глибицкий Д. М. Текстуры пленок Na-DNA, полученные из растворов, содержащих ТРИС и ЭДТА // *Біофіз. вісн.* 2011. Вип. 27(2). С. 26–30.
4. Glibitskiy G. M., Jelali V. V., Semenov M. O., Roshal A. D., Glibitskiy D. M., Volyanskiy O. Yu., Zegrya G. G. Interaction of DNA with silver nanoparticles // *Ukr. J. Phys.* 2012. Vol. 57(7). P. 695–699.
5. Glibitskiy D. M., Glibitskiy G. M., Semenov M. A., Shestopalova A. V. Textures of BSA films with iron and copper ions // *Biophys. Bull.* 2016. Vol. 35(1). P. 21–27.
6. Glibitskiy D. M., Gorobchenko O. A., Nikolov O. T., Shestopalova A. V., Semenov M. A. Characterization of zigzag patterns on the surface of bovine serum albumin films // *Biophys. Bull.* 2017. Vol. 37(1). P. 16–29. DOI: 10.26565/2075-3810-2017-37-03
7. Glibitskiy D. M. Modeling of protein and salt redistribution during drying of a solution from a square cell // *Biophys. Bull.* 2018. Vol. 39(1). P. 55–74. DOI: 10.26565/2075-3810-2018-39-05
8. Glibitskiy D. M., Glibitskiy G. M., Gorobchenko O. O., Nikolov O. T., Semenov M. A. Textures of BSA films with sodium halides //

- Nanotechnology and nanomaterials: abstr. International research and practice conference, 23–30 Aug. 2014. Yaremche; Lviv, 2014. P. 538.
9. Glibitskiy G. M., Glibitskiy D. M., Gorobchenko O. A., Nikolov O. T., Roshal A. D., Semenov M. A. Properties of films of bovine serum albumin with sodium halides // Nanobiophysics 2015: Fundamental and Applied Aspects: abstr. IV International Conference, 1–4 Oct. 2015. Kyiv, 2015. P. 44.
 10. Gorobchenko O. A., Nikolov O. T., Glibitskiy D. M., Roshal A. D., Shestopalova A. V., Semenov M. A., Glibitskiy G. M. Effect of gamma irradiation of protein solution on the formation of film textures // Nanotechnology and nanomaterials: abstr. International research and practice conference, 26–29 Aug. 2015. Lviv, 2015. P. 386.
 11. Glibitskiy D. M., Gorobchenko O. A., Nikolov O. T., Zibarov A. M., Roshal A. D., Semenov M. A., Glibitskiy G. M. Effect of flavin mononucleotide on the texture of BSA films // Nanotechnology and nanomaterials: abstr. International research and practice conference, 24–27 Aug. 2016. Lviv, 2016. P. 132.
 12. Glibitskiy D. M., Zibarov A. M. Effect of Fe(III) on BSA and its film textures // Applied Physics and Engineering : abstr. 2nd International Young Scientists Forum, 10–16 Oct. 2016. Kharkiv, 2016. 1 electronic optical disc (CD-ROM).
 13. Glibitskiy D. M., Gorobchenko O. A., Zibarov A. M., Cheipesh T. A., Nikolov O. T., Roshal A. D., Semenov M. A., Glibitskiy G. M. Zigzag patterns on the surface of BSA+AlCl₃ films // Nanotechnology and Nanomaterials (NANO-2017) : abstr. International research and practice conference, 23–26 Aug. 2017. Chernivtsi, 2017. P. 601.
 14. Glibitskiy D. M., Cheipesh T. A., Gorobchenko O. A., Zibarov A. M., Nikolov O. T., Roshal A. D., Semenov M. A., Glibitskiy G. M. Comparison of spectral, light scattering and zigzag pattern analysis methods // Nanotechnology and Nanomaterials (NANO-2017): abstr. International research and practice conference, 23–26 Aug. 2017. Chernivtsi, 2017. P. 602.

15. Glibitskiy D. M., Gorobchenko O. A., Zibarov A. M., Cheipesh T. A., Nikolov O. T., Roshal A. D., Semenov M. A., Glibitskiy G. M. Dynamic light scattering, spectral and zigzag pattern analysis of solutions and films of BSA with FeCl_3 // NANOBIOPHYSICS: Fundamental and Applied Aspects (NBP-2017): abstr. 5th International Conference, 2–5 Oct. 2017. Kharkiv, 2017. P. 60.
16. Glibitskiy D. Modeling of particle redistribution in protein-salt solution evaporating from a square cell // Abstr. 1st International Symposium on Mechanics, 9–12 July 2018. Aberdeen (UK), 2018. URL: https://conferences-nscj.co.uk/abstract/files/10/abstract/me01_A0878.pdf (retrieved 2018-03-25).
17. Glibitskiy D., Gorobchenko O., Nikolov O., Cheipesh T., Roshal A., Zibarov A., Semenov M., Glibitskiy G. Statistical differences of zigzag patterns on films obtained from gamma irradiated BSA solutions // Abstr. 1st International Symposium on Mechanics, 9–12 July 2018. Aberdeen (UK), 2018. URL: https://conferences-nscj.co.uk/abstract/files/10/abstract/me01_A0877.pdf (retrieved 2018-03-25).
18. Спосіб визначення впливу речовини на біополімери: пат. на винахід №110130 Україна / Глибицький Г. М., Глибицький Д. М.; Ін-т радіофізики та електроніки імені О. Я. Усикова НАН України. № а2013 12 123; заявлено 16.10.2013; опубл. 25.11 2015, Бюл. № 22.
19. Gorza F. D. S., Pedro G. C., Trescher T. F., da Silva R. J., Silva J. R., de Souza N. C. Morphological analysis and interaction of chlorophyll and BSA // BioMed. Res. Int. 2014. Vol. 2014. Article ID 872701.
20. Dugas V., Broutin J., Souteyrand E. Droplet evaporation study applied to DNA chip manufacturing // Langmuir. 2005. Vol. 21. P. 9130–9136.
21. Takhistov P., Chang H. C. Complex stain morphologies // Ind. Eng. Chem. Res. 2002. Vol. 41. P. 6256–6269. DOI: 10.1021/ie010788+
22. Brutin D., Sobac D., Loquet B., Sampol J. Pattern formation in drying drops of blood // J. Fluid Mech. 2011. Vol. 667. P. 85–95.

23. Killeen A. A., Ossina N., McGlennen R. C., Minnerath S., Borgos J., Alexandrov V., Sarvazyan A. Protein self-organization patterns in dried serum reveal changes in B-cell disorders // *Mol. Diagn. Ther.* 2006. Vol. 10(6). P. 371–380.
24. Chen R., Zhang L., Zang D., Shen W. Blood drop patterns: formation and applications // *Adv. Col. Interf. Sci.* 2016. Vol. 231. P. 1–14.
25. Sikarwar B. S., Roy M., Ranjan P., Goyal A. Automatic pattern recognition for detection of disease from blood drop stain obtained with microfluidic device // *Adv. Signal Process. Intell. Recognit. Syst.* 2015. Vol. 425. P. 655–667.
26. Kokornaczyk M., Kahl J., Roose M., Busscher N., Ploeger A. Organic wheat quality from a defined Italian field-trial // *Abstr. 16th IFOAM Organic World Congress*, 16–20 June 2008. Modena (Italy), 2008. URL: http://orgprints.org/11732/1/Kokornaczyk_11732_rev.doc (retrieved 2017-06-19).
27. Kokornaczyk M. O., Dinelli G., Marotti I., Benedettelli S., Nani D., Betti L. Self-organized crystallization patterns from evaporating droplets of common wheat grain leakages as a potential tool for quality analysis // *Sci. World J.* 2011. Vol. 11. P. 1712–1725.
28. Andersen J.-O., Henriksen C. B., Laursen J., Nielsen A. A. Computerised image analysis of biocrystallograms originating from agricultural products // *Comput. Electron. Agric.* 1999. Vol. 22. P. 51–69.
29. Busscher N., Kahl J., Andersen J. O., Huber M., Mergardt G., Doesburg P., Paulsen M., Ploeger A. Standardization of the biocrystallization method for carrot samples // *Biol. Agric. Hortic.* 2010. Vol. 27. P. 1–23.
30. Kim N., Li Z., Hurth C., Zenhausern F., Chang S.-F., Attinger D. Identification of fluid and substrate chemistry based on automatic pattern recognition of stains // *Anal. Methods.* 2012. Vol. 4. P. 50–57.
31. Dai S., Zhang X., Du Z., Dang H. Fabrication of nanopatterned DNA films by Langmuir–Blodgett technique // *Mater. Lett.* 2005. Vol. 59. P. 423–429.
32. Khatir N. M., Banihashemian S. M., Periasamy V., Majid W. H., Rahman S. A., Shahhosseini F. DNA strand patterns on aluminium thin

- films // *Sensors*. 2011. Vol. 11. P. 6719–6727.
33. Tarasevich Yu. Yu. Mechanisms and models of the dehydration self-organization in biological fluids // *Phys. Usp.* 2004. Vol. 47(7). P. 779–790.
 34. Tarasevich Yu. Yu., Isakova O. P., Kondukhov V. V., Savitskaya A. V. Effect of evaporation conditions on the spatial redistribution of components in an evaporating liquid drop on a horizontal solid substrate // *Tech. Phys.* 2010. Vol. 55(5). P. 636–644.
 35. Tarasevich Yu. Yu., Pravoslavnova D. M. Drying of a multicomponent solution drop on a solid substrate: qualitative analysis // *Tech. Phys.* 2007. Vol. 52(2). P. 159–163.
 36. Tarasevich Yu. Yu., Vodolazskaya I. V., Bondarenko O. P. Modeling of spatial–temporal distribution of the components in the drying sessile droplet of biological fluid // *Col. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*. 2013. Vol. 432. P. 99–103.
 37. Тарасевич Ю. Ю., Константинов В. О., Аюпова А. К. Моделирование дендритного роста кристаллов соли в биологических жидкостях // *Изв. вузов. Северокавказский регион. Естественные науки*. 2001. Спецвып. Математическое моделирование. С. 147–149.
 38. Заблоцкая Т. Ю. Анализ основных процессов и типов структур при дегидратации биологических жидкостей // *Електромеханічні і енергозберігаючі системи*. 2010. Вип. 4(12). С. 92–95.
 39. Choudhury M. D., Dutta T., Tarafdar S. Growth kinetics of NaCl crystals in a drying drop of gelatin: transition from faceted to dendritic growth // *Soft Mat.* 2015. Vol. 11. P. 6938–6947.
 40. Bhardwaj R., Fang X., Somasundaran P., Attinger D. Self-assembly of colloidal particles from evaporating droplets: role of DLVO interactions and proposition of a phase diagram // *Langmuir*. 2010. Vol. 26(11). P. 7833–7842.
 41. Тарасевич Ю. Ю., Аюпова А. К. Влияние диффузии на разделение компонентов биологической жидкости при клиновидной дегидратации // *Журн. тех. физ.* 2003. Том 73(5). С. 13–18.

42. Yakhno T. A. Salt-induced protein phase transitions in drying drops // *J. Col. Interf. Sci.* 2008. Vol. 318. P. 225–230.
43. Yakhno T. A. Sodium chloride crystallization from drying drops of albumin-salt solutions with different albumin concentrations // *Tech. Phys.* 2015. Vol. 60(11). P. 1601–1608.
44. Яхно Т. А., Яхно В. Г., Санин А. Г., Санина О. А., Пелюшенко А. С. Белок и соль. Пространственно-временные события в высыхающей капле // *Журн. тех. физ.* 2004. Том 74(8). С. 100–108.
45. Яхно Т. А., Яхно В. Г. Основы структурной эволюции высыхающих капель биологических жидкостей // *Журн. тех. физ.* 2009. Том 79(8). С. 133–141.
46. Annarelli C. C., Reyes L., Fornazero J., Bert J., Cohen R., Coleman A. W. Ion and molecular recognition effects on the crystallisation of bovine serum albumin–salt mixtures // *Cryst. Eng.* 2000. Vol. 3. P. 173–194.
47. Annarelli C., Reyes L., Fornazero J., Bert J., Cohen R., Coleman A. W. On the control of crystal growth in bovine serum albumin-sodium chloride thin film gels // *Cryst. Eng.* 1999. Vol. 2(1). P. 79–89.
48. Gorr H. M., Zueger J. M., McAdams D. R., Barnard J. A. Salt-induced pattern formation in evaporating droplets of lysozyme solutions // *Col. Surf. B: Biointerfaces*. 2013. Vol. 103. P. 59–66.
49. Sclavi B., Peticolas W. L., Powell J. W. Fractal-like patterns in DNA films, B form at 0% relative humidity, and antiheteronomous DNA: an IR study // *Biopolymers*. 1994. Vol. 34. P. 1105–1113.
50. Mayeres C. H., Lee S. A., Pinnick D. A., Carter B. J., Kim J. A study of Na-DNA films containing NaCl via scanning electron and tunneling microscopies // *Biopolym.* 1995. Vol. 36. P. 669–673.
51. Lazar A. N., Shahgaldian P., Coleman A. W. Anion recognition effects in the structuring of bovine serum albumin films // *J. Supramol. Chem.* 2001. Vol. 1. P. 193–199.

52. Ben-Jacob E., Garik P. The formation of pattern in non-equilibrium growth // Nat. 1990. Vol. 343. P. 523–530.
53. Mullins W. W., Sekerka R. F. Stability of a planar interface during solidification of a dilute binary alloy // J. Appl. Phys. 1964. Vol. 35(2). P. 444–451.
54. Raz E., Lipson E., Ben-Jacob E. New periodic morphologies observed during dendritic growth of ammonium chloride crystals in thin layers // J. Cryst. Growth. 1991. Vol. 108. P. 637–647.
55. Haidara H., Mougin K., Schultz J. Spontaneous growth of two-dimensional complex patterns of nanoparticles at model molecular surfaces // Langmuir. 2001. Vol. 17. P. 659–663.
56. Mougin K., Haidara H. Complex pattern formation in drying dispersions // Langmuir. 2002. Vol. 18. P. 9566–9569.
57. Darwich S., Mougin K., Haidara H. Complex aggregation patterns in drying nanocolloidal suspensions: size matters when it comes to the thermomechanical stability of nanoparticle-based structures // Langmuir. 2010. Vol. 26(22). P. 16928–16933.
58. Darwich S., Mougin K., Haidara H. From highly ramified, large scale dendrite patterns of drying “alginate/Au NPs” solutions to capillary fabrication of lab-scale composite hydrogel microfibers // Soft Mat. 2012. Vol. 8. P. 1155–1162.
59. Choudhury M. D., Dutta T., Tarafdar S. Pattern formation in droplets of starch gels containing NaCl dried on different surfaces // Col. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects. 2013. Vol. 432. P. 110–118.
60. Chen G., Mohamed G. J. Complex protein patterns formation via salt-induced self-assembly and droplet evaporation // Eur. Phys. J. E. 2010. Vol. 33. P. 19–26.
61. Wang M., Liu X.-Y., Strom C. S., Bennema P., van Enckevort W., Ming N.-B. Fractal aggregations at low driving force with strong anisotropy // Phys. Rev. Lett. 1998. Vol. 80(14). P. 3089–3092.

62. Liu X.-Y., Wang M., Li D.-W., Strom C. S., Bennema P., Ming N.-B. Nucleation-limited aggregation of crystallites in fractal growth // J. Cryst. Growth. 2000. Vol. 208. P. 687–695.
63. Glibitskiy G. M. Scale invariant fractal textures of serum albumin and Na-DNA films from solutions with metal halides // Bioph. Bull. 2014. Vol. 31(1). P. 23–28.
64. Bhardwaj R., Fang X., Attinger D. Pattern formation during the evaporation of a colloidal nanoliter drop: a numerical and experimental study // New J. Phys. 2009. Vol. 11(7). P. 075020.
65. Sommer A. P., Ben-Moshe M., Magdassi S. Size-discriminative self-assembly of nanospheres in evaporating drops // J. Phys. Chem. B. 2004. Vol. 108. P. 8–10.
66. Dutta T., Giri A., Choudhury M. D., Tarafdar S. Experiment and simulation of multifractal growth of crystalline NaCl aggregates in aqueous gelatin medium // Col. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects. 2013. Vol. 432. P. 127–131.
67. Zhong X., Crivoi A., Duan F. Sessile nanofluid droplet drying // Adv. Col. Interf. Sci. 2015. Vol. 217. P. 13–30.
68. Елизаров А. И., Заблоцкая Т. Ю. Метод количественной оценки изображений с центральной симметрией на примере фаций биологических жидкостей // Вісн. Кременчуг. держ. політехн. ун-ту. 2007. Вип. 1(42). С. 8–13.
69. Carstensen J. M. Description and simulation of visual texture : Ph. D. thesis / Department of Mathematical Modelling, Technical University of Denmark. Copenhagen, 1992. 125 p.
70. Kahl J., Busscher N., Doesburg P., Mergardt G., Huber M., Ploeger A. First tests of standardized biocrystallization on milk and milk products // Eur. Food Res. Technol. 2009. Vol. 229. P. 175–178.
71. Благой Ю. П., Галкин В. Л., Гладченко Г. О., Корнилова С. В., Сорокин В. А., Шкорбатов А. Ф. Металлокомплексы нуклеиновых

- кислот в растворах. Киев : Наук. думка, 1991. 270 с.
72. Благой Ю. П. Взаимодействие ДНК с биологически активными веществами (ионами металлов, красителями, лекарствами) // Сорос. образоват. журн. 1998. № 10. С. 117–124.
 73. Zozulya V. N., Nesterov A. B., Ryazanova O. A., Blagoi Yu. P. Conformational transitions and aggregation in poly(dA)-poly(dT) system induced by Na^+ and Mg^{2+} ions // Intern. J. Biol. Macromol. 2003. Vol. 33(4–5). P. 183–191.
 74. Blagoi Yu., Zozulya V., Egupov S., Onishchenko V., Gladchenko G. Thermodynamic analysis of conformational transitions in oligonucleotide complexes in presence of Na^+ and Mg^{2+} ions, using “Staggering Zipper” model // Biopolymers. 2007. Vol. 86(1). P. 32–40.
 75. Чаговец В. В., Боряк О. А., Косевич М. В., Степаньян С. Г. Масс-спектрометрическое и квантово-химическое изучение взаимодействия азотистых оснований с анионом хлора и катионом натрия // Біофіз. вісн. 2007. Вип. 19(2). С. 43–50.
 76. Рубин Ю. В., Белоус Л. Ф., Якуба А. А. Молекулярная и электронная структуры фрагмента металлизированной ДНК-пары аденин-тимин с ионом цинка // Доп. НАН України. 2008. № 5. С. 186–191.
 77. Medda L., Barse B., Cugia F., Bostrom M., Parsons D. F., Ninham B. W., Monduzzi M., Salis A. Hofmeister challenges: ion binding and charge of the BSA protein as explicit examples // Langmuir. 2012. Vol. 28. P. 16355–16363.
 78. Savelyev A., Papoian G. A. Electrostatic, steric, and hydration interactions favor Na^+ condensation around DNA compared with K^+ // J. Am. Chem. Soc. 2006. Vol. 128. P. 14506–14518.
 79. Wang G., Tang W., Hao X., Yan C., Lu Y. Binding mechanism of halide ions to bovine serum albumin and hemoglobin: investigated by ion selective-electrode // J. Biophys. Chem. 2011. Vol. 2(3). P. 194–201.
 80. Pillai C. K. S., Sunderesan N., Radhakrishnan M. P., Thomas T., Thomas T. J. Investigations on the liquid crystalline phases of cation-induced condensed DNA // Pranama – journal of physics. 2005. Vol. 65(4). P. 723–729.

81. Arakawa H., Neault J. F., Tajmir-Riahi H. A. Silver(I) complexes with DNA and RNA studied by fourier transform infrared spectroscopy and capillary electrophoresis // *Biophys. J.* 2001. Vol. 81(3). P. 1580–1587.
82. Xu X., Zhang L., Shen D., Wu H., Liu Q. Oxygen-dependent oxidation of Fe(II) to Fe(III) and interaction of Fe(III) with bovine serum albumin, leading to a hysteretic effect on the fluorescence of bovine serum albumin // *J. Fluoresc.* 2008. Vol. 18(1). P. 193–201.
83. Fatemi S. J. A., Williamson D. J., Moore G. R. A ^{27}Al NMR investigation of Al^{3+} binding to small carboxylic acids and the proteins albumin and transferrin // *J. of Inorganic Biochemistry.* 1992. Vol. 46(1). P. 35–40.
84. Zatta P., Via L. D., Noto V. D. Binding studies on aluminum(III)-albumin interaction // *Arch. Biochem. Biophys.* 2003. Vol. 417. P. 59–64.
85. Masuoka J., Hegenauer J., Van Dyke B. R., Saltman P. Intrinsic stoichiometric equilibrium constants for the binding of zinc(II) and copper(II) to the high affinity site of serum albumin // *J. Biol. Chem.* 1993. Vol. 268(29). P. 21533–21537.
86. Bala W., Christodoulou J., Sadler P. J., Tucker A. Multi-metal binding site of serum albumin // *J. of Inorganic Biochemistry.* 1998. Vol. 70(1). P. 33–39.
87. Lee J. S., Latimer L. J. P. A cooperative conformational change in duplex DNA induced by Zn^{2+} and other divalent metal ions // *Biochem. Cell Biol.* 1993. Vol. 71. P. 162–168.
88. Keller P. B., Hartman K. A. The effect of ionic environment and mercury(II) binding on the alternative structures of DNA. An infrared spectroscopic study // *Spectrochim. Acta.* 1986. Vol. 42A(2/3). P. 299–306.
89. Loprete D. M., Hartman K. A. Conditions for the stability of the B, C, and Z structural forms of poly(dG-dC) in the presence of lithium, potassium, magnesium, calcium, and zinc cations // *Biochem.* 1993. Vol. 32. P. 4077–4082.
90. Dove W. F., Davidson N. Cation effects on the denaturation of DNA // *J. Mol. Biol.* 1962. Vol. 5. P. 467–478.

91. Knoll D. A., Fried M. G., Bloomfield V. A. Heat-induced DNA aggregation in the presence of divalent metal salts // *Structure and Expression: DNA and Drug complexes* / Eds. R. H. Sarma, M. H. Sarma. New York, 1988. Vol. 2. P. 123–146.
92. Tajmir-Riahi H. A., Ahmad R., Naoui M., Diamantoglou S. The effect of HCl on the solution structure of calf thymus DNA: a comparative study of DNA denaturation by proton and metal cations using fourier transform IR difference spectroscopy // *Biopolym.* 1995. Vol. 35. P. 493–501.
93. Widom J., Baldwin R. L. Cation-induced toroidal condensation of DNA studies with $\text{Co}^{3+}(\text{NH}_3)_6$ // *J. Mol. Biol.* 1980. Vol. 144. P. 431–453.
94. Anastassopoulou J. Metal–DNA interactions // *J. Mol. Struct.* 2003. Vol. 651–653. P. 19–26.
95. Klotz I. M., Ayers J. Protein interactions with organic molecules // *Faraday Society Discuss.* 1953. Vol. 13. P. 189–196.
96. Stellwagen N. C., Bossi A., Gelfi C., Righetti P. G. DNA and buffers: are there any noninteracting, neutral pH buffers? // *Analytical Biochemistry.* 2000. Vol. 287. P. 167–175.
97. Sengupta A., Sasikala W. D., Mukherjee A., Hazra P. Comparative study of flavins binding with human serum albumin: a fluorometric, thermodynamic, and molecular dynamics approach // *Chemphyschem.* 2012. Vol. 13(8). P. 2142–2153.
98. Sawada O., Tshida T., Horiike K. Frontal gel chromatographic analysis of the interaction of a protein with self-associating ligands: aberrant saturation in the binding of flavins to bovine serum albumin // *J. Biochem.* 2001. Vol. 129. P. 899–907.
99. Wetzel R., Becker M., Behlke J., Billwitz H., Böhm S., Ebert B., Hamann H., Krumbiegel J., Lassmann G. Temperature behavior of human serum albumin // *Eur. J. Biochem.* 1980. Vol. 104. P. 469–478.
100. Davies M. J. The oxidative environment and protein damage // *Bioch. Bioph. Acta.* 2005. Vol. 1703. P. 93–109.

101. Gaber M. H. Effect of γ -irradiation on the molecular properties of bovine serum albumin // J. Biosci. Bioeng. 2005. Vol. 100(2). P. 203–206.
102. Pomerai D. I., Smith B., Dawe B., North K., Smith T., Archer D. B., Duce I. R., Jones D., Candido E. P. M. Microwave radiation can alter protein conformation without bulk heating // FEBS Lett. 2003. Vol. 543. P. 93–97.
103. Foley S., Staicu A., Pascu A., Enescu M. Photolysis of bovine serum albumin by near UV irradiation // Abstr. Proc. XIVth European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules, Aug 2011. Coimbra, 2011. URL: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00933452/document> (retrieved 2017-08-23).
104. Lee M., Lee S., Song K. B. Effect of γ -irradiation on the physicochemical properties of soy protein isolate films // Radiat. Phys. Chem. 2005. Vol. 72. P. 35–40.
105. Oliveira C. L. P., Hoz L., Silva J. C., Torriani I. L., Netto F. M. Effects of gamma radiation on β -lactoglobulin: oligomerization and aggregation // Biopolym. 2007. Vol. 85(3). P. 284–294.
106. Mishra K., Ojha H., Kallepalli S., Alok A., Chaudhury N. K. Protective effect of ferulic acid on ionizing radiation induced damage in bovine serum albumin // Int. J. Radiat. Res. 2014. Vol. 12(2). P. 113–121.
107. Saad-El-Din A. A., El-Tanahy Z. H., El-Sayed S. N., Anees L. M., Farroh H. A. Combined effect of arsenic trioxide and radiation on physical properties of hemoglobin biopolymer // J. Radiat. Res. Appl. Sci. 2014. Vol. 7. P. 1–6.
108. Henley E. J., Johnson E. R. The chemistry and physics of high energy reactions. Washington (D. C.) : Univ. Press, 1969.
109. Davies K. J. A. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects // J. Biol. Chem. 1987. Vol. 262. P. 9895–9901.
110. Achilli E., Casajus G., Siri M., Flores C., Kadłubowski S., Alonso S. del V., Grasselli M. Preparation of protein nanoparticle by dynamic aggregation and ionizing-induced crosslinking // Col. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects. 2015. Vol. 486. P. 161–171.

111. Rozhkov S. P., Goryunov A. S. Effects of inorganic salts on the structural heterogeneity of serum albumin solutions // *Eur. Biophys. J.* 2000. Vol. 28. P. 639–647.
112. Cho Y. S., Song K. B. Effect of γ -irradiation on the molecular properties of bovine serum albumin and β -lactoglobulin // *J. Biochem. Mol. Biol.* 2000. Vol. 33(2). P. 133–137.
113. Kar T., Basak P., Ghosh R. K., Bhattacharyya M. Protective effects of curcumin against gamma ray induced conformational change of human serum albumin // *Int. J. Biol. Macromol.* 2017. Vol. 99. P. 600–607.
114. Queiroz R. G., Varca G. H. C., Kadlubowski S., Ulanski P., Lugão A. B. Radiation-synthesized protein-based drug carriers. Size-controlled BSA nanoparticles // *Int. J. Biol. Macromol.* 2016. Vol. 85. P. 82–91.
115. Akhavan A., Kalhor H. R., Kassaei M. Z., Sheikh N., Hassanlou M. Radiation synthesis and characterization of protein stabilized gold nanoparticles // *Chem. Eng. J.* 2010. Vol. 159. P. 230–235.
116. Varca G. H. C., Queiroz R. G., Lugão A. B. Irradiation as an alternative route for protein crosslinking: cosolvent free BSA nanoparticles // *Radiat. Phys. Chem.* 2016. Vol. 124. P. 111–115.
117. Geng S.-R., Cheng W., Liao T., Xiong G.-Q., Li X., Zu X.-Y., Chen H.-G. Effects of γ rays and electron beam irradiation on bovine serum albumin structure // *Modern Food Sci. Technol.* 2016. Vol. 32. P. 211–217.
118. Zarei H., Bahreinipour M., Eskandari K., Zarandi S.-A. M., Ardestani S. K. Spectroscopic study of gamma irradiation effect on the molecular structure of bovine serum albumin // *Vac.* 2017. Vol. 136. P. 91–96.
119. Glibitskiy G. M. Na-DNA films with ions of metals // *Bioph. Bull.* 2008. Vol. 21(2). P. 29–34.
120. Семенов М. А., Сухоруков Б. И., Малеев В. Я. Гидратируются ли азотистые основания при низкой влажности? // *Биофиз.* 1981. Т. 26. С. 979–984.
121. Семенов М. А. Молекулярная генетика и биофизика. Киев : КГУ, 1984.

- C. 25.
122. Corbett J.C.W., Connah M.T., Mattison K. Advances in the measurement of protein mobility using laser Doppler electrophoresis – the diffusion barrier technique // *Electrophoresis*. 2011. Vol. 32(14). P. 1787–1794.
 123. Wilemski G. On the derivation of Smoluchowski equations with corrections in the classical theory of Brownian motion // *J. Stat. Phys.* 1976. Vol. 14(2). P. 153–169.
 124. Hackl E. V., Gatash S. V., Nikolov O. T. Using UHF-dielectrometry to study protein structural transitions // *J. Biochem. Biophys. Methods*. 2005. Vol. 63. P. 137–148.
 125. Debye P. Polar molecules. New York : Chemical Catalog Co., Inc., 1929. 172 p.
 126. Kaatze U. Complex permittivity of water as a function of frequency and temperature // *J. Chem. Eng. Data*. 1989. Vol. 34. P. 371–374.
 127. Shannon C. E. Communication in the presence of noise // *Proceedings of the IRE*. 1949. Vol. 37(1). P. 10–21.
 128. Holt D., Steel D. G., Tranmer M., Wrigley N. Aggregation and ecological effects in geographically based data // *Geographical Analysis*. 1996. Vol. 28(3). P. 244–261.
 129. Clark W. A. V., Avery K. L. The effects of data aggregation in statistical analysis // *Geogr. Anal.* 1976. Vol. 8(4). P. 428–438.
 130. Mandelbrot B. The fractal geometry of nature. W. H. Freeman and Co. (USA), 1982. 468 p.
 131. Smith T. G. (Jr.), Lange G. D., Marks W. B. Fractal methods and results in cellular morphology – dimensions, lacunarity and multifractals // *J. Neurosci. Methods*. 1996. Vol. 69. P. 123–136.
 132. Глибицкий Г. М., Красницкая А. А., Гудзенко В. И. Текстуры пленок, полученных из растворов при различных влажностях и температурах // *Біофіз. вісн.* 2006. Вип. 17(1). С. 89–94.

133. Спосіб визначення впливу речовини на біополімери : пат.111769 Україна / Глибицький Г. М., Глибицький Д. М. ; Ін-т радіофізики та електроніки імені О. Я. Усикова НАН України. № а201408411 ; заявлено 25.11.2014 ; опубл. 10.06.2016, Бюл. № 11.
134. Mitzenmacher M. A brief history of generative models for power law and lognormal distributions // Internet Math. 2003. Vol. 1(2). P. 226–251.
135. Burr I. W. Cumulative frequency functions // Ann. Math. Stat. 1942. Vol. 13(2). P. 215–232.
136. de Gusmao F. R. S., Ortega E. M. M., Cordeiro G. M. The generalized inverse Weibull distribution // Stat. Papers. 2011. Vol. 52. P. 591–619.
137. Hua H., Larson R. G. Marangoni effect reverses coffee-ring depositions // J. Phys. Chem. B. 2006. Vol. 110. P. 7090–7094.
138. Nabil M., Rattner A. S. interThermalPhaseChangeFoam – A framework for two-phase flow simulations with thermally driven phase change // SoftwareX. 2016. Vol. 5. P. 216–226.
139. Rattner A. S., Garimella S. Simple mechanistically consistent formulation for volume-of-fluid based computations of condensing flows // J. Heat Transfer. 2014. Vol. 136. P. 071501-1–071501-9.
140. Engländer T., Wiegel D., Naji L., Arnold K. Dehydration of glass surfaces studied by contact angle measurements // J. Col. Interf. Sci. 1996. Vol. 179(2). P. 635–636.
141. OpenFOAM v5 user guide: 5.2 boundaries. URL: <https://cfd.direct/openfoam/user-guide/boundaries/> (retrieved 2018-04-05).
142. Brackbill J. U., Kothe D. B., Zemach C. A continuum method for modeling surface-tension // J. Comput. Phys. 1992. Vol. 100(2). P. 335–354.
143. Wagner W., Pruss A. The IAPWS formulation 1995 for the thermodynamic properties of ordinary water substance for general and scientific use // J. Phys. Chem. Ref. Data. 2002. Vol. 31. P. 387–535.
144. Dean J. A., Lange N. A. Lange's handbook of chemistry. 15th edition. McGraw-Hill Professional, 1999. 1424 p.

145. Cox J. D., Wagman D. D., Medvedev V. A. CODATA – key values for thermodynamics, aus der Reihe: CODATA, series on thermodynamic properties. New York ; Washington ; Philadelphia ; London : Hemisphere Publishing Corporation, 1989. 271 p.
146. Jung N., Seo H. W., Leo P. H., Kim J., Kim P., Yoo C. S. Surfactant effects on droplet dynamics and deposition patterns: a lattice gas model // *Soft Mat.* 2017. Vol. 13. P. 6529–6541.
147. Crivoi A., Duan F. Three-dimensional Monte Carlo model of the coffee-ring effect in evaporating colloidal droplets // *Sci. Rep.* 2014. Vol. 4. Article ID 4310.
148. Jachimska B., Pajor A. Physico-chemical characterization of bovine serum albumin in solution and as deposited on surfaces // *Bioelectrochem.* 2012. Vol. 87. P. 138–146.
149. Putnam F. W. The plasma proteins: structure, function and genetic control. Vol. 1. 2nd ed. New York: Acad. Press, 1975. P. 141, 147.
150. Wise S. A., Watters R. L. Bovine serum albumin (7% solution). certificate of analysis // United States National Institute of Standards & Technology. URL: <https://www-s.nist.gov/srmors/certificates/927d.pdf> (retrieved 2010-06-30).
151. Hussain A. A., Abashar M. E. E., Al-Mutaz I. S. Effect of ion sizes on separation characteristics of nanofiltration membrane systems // *J. King Saud Univ.* 2006. Vol. 19. Eng. Sci. 1. P. 1–19.
152. Bondi A. Van der Waals volumes and radii // *J. Phys. Chem.* 1964. Vol. 68(3). P. 441–451.
153. Meija J., Coplen T. B., Berglund M., Brand W. A., De Bièvre P., Gröning M., Holden N. E., Irrgeher J., Loss R. D., Walczyk T., Prohaska T. Atomic weights of the elements 2013 (IUPAC technical report) // *Pure Appl. Chem.* 2016. Vol. 88(3). P. 265–291.
154. Buscall R., D’Haene P., Mewis J. Maximum density for flow of dispersions of near monodisperse spherical-particles // *Langmuir.* 1994. Vol. 10. P. 1439–1441.
155. Pusey P. N., van Megen W. Phase behavior of concentrated suspensions of

- nearly hard colloidal spheres // *Nat.* 1986. Vol. 320. P. 340–342.
156. van Meegen W., Underwood S. M. Glass transition in colloidal hard spheres: measurement and mode-coupling-theory analysis of the coherent intermediate scattering function // *Phys. Rev. E.* 1994. Vol. 49. P. 4206–4220.
 157. Meeker S. P., Poon W. C. K., Pusey P. N. Concentration dependence of the low-shear viscosity of suspensions of hard-sphere colloids // *Phys. Rev. E.* 1997. Vol. 55. P. 5718–5722.
 158. Phan S.-E., Russel W. B., Cheng Z., Zhu J. Phase transition, equation of state, and limiting shear viscosities of hard sphere dispersions // *Phys. Rev. E.* 1996. Vol. 54. P. 6633–6645.
 159. Farr R. S., Groot R. D. Close packing density of polydisperse hard spheres // *J. Chem. Phys.* 2009. Vol. 131. P. 244104.
 160. Krieger I. M., Dougherty T. J. A mechanism for non-Newtonian flow in suspensions of rigid spheres // *Trans. Soc. Rheol.* 1959. Vol. 3. P. 137–152.
 161. Livolant F. Cholesteric liquid crystalline phases given by three helical biological polymers: DNA, PBLG and xanthan. A comparative analysis of their textures // *J. Phys. France.* 1986. Vol. 47. P. 1605–1616.
 162. Pelta J., Durand D., Doucet J., Livolant F. DNA mesophases induced by spermidine: structural properties and biological implications // *Biophys. J.* 1996. Vol. 71(1). P. 48–63.
 163. Brooke D., Movahed N., Bothner B. Universal buffers for use in biochemistry and biophysical experiments // *AIMS Biophys.* 2015. Vol. 2(3). P. 336–342.
 164. Teramoto Y., Nishio Y. Biodegradable cellulose diacetate-graft-poly(L-lactide)s: thermal treatment effect on the development of supramolecular structures // *Biomacromol.* 2004. Vol. 5. P. 397–406.
 165. Ivanov D. A., Rosenthal M. Microstructure of banded polymer spherulites: new insights from synchrotron nanofocus X-ray scattering // *Polym. Crystallization.* 2016. Vol. 2. P. 95–126.

166. Perepelytsya S. M., Glibitskiy G. M., Volkov S. N. Texture formation in DNA films with alkali metal chlorides // *Biopolym.* 2013. Vol. 99(8). P. 508–516.
167. Lewicki P. P. Water as the determinant of food engineering properties // *J. Food Eng.* 2004. Vol. 61. P. 483–495.
168. Lakowicz J. R. Principles of fluorescence spectroscopy. New York : Springer, 2004.
169. Lehrer S. S. Solute perturbation of protein fluorescence. The quenching of the tryptophyl fluorescence of model compounds and of lysozyme by iodide ion // *Biochem.* 1971. Vol. 10. P. 3254–3263.
170. Lehrer S. S., Leavis P. C. Solute quenching of protein fluorescence // *Methods Enzymol.* 1978. Vol. 49. P. 222–236.
171. Noel J. K., Hunter M. J. Bovine mercaptalbumin and nonmercaptalbumin monomers. Interconversions and structural differences // *J. Biol. Chem.* 1972. Vol. 247. P. 7391–7406.
172. Moller M., Denicola A. Protein tryptophan accessibility studied by fluorescence quenching // *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 2002. Vol. 30. P. 175–178.
173. Hasted J. B., Ritson D. M., Collie C. H. Dielectric properties of aqueous ionic solutions. Parts I and II // *J. Chem. Phys.* 1948. Vol. 16. P. 1–21.
174. Lee S. H., Rasaiah J. C. Molecular dynamics simulation of ion mobility. 2. Alkali metal and halide ions using the SPC/E model for water at 25 °C // *J. Phys. Chem.* 1996. Vol. 100. P. 1420–1425.
175. Privalov P. L. Water and its role in biological systems // *Biofizika.* 1968. Vol. 13. P. 163–167.
176. Infantes L., Fábíán L., Motherwell W. D. S. Organic crystal hydrates: what are the important factors for formation // *CrystEngComm.* 2007. Vol. 9. P. 65–71.
177. McPherson A, Gavira J. A. Introduction to protein crystallization // *Acta Cryst.* 2014. Section F70. P. 2–20.

178. Rhodes G. Crystallography made crystal clear, third edition: a guide for users of macromolecular models, 3rd ed. Academic Press, 2006. 352 p.
179. D'Arcy A. Crystallizing proteins – a rational approach? // *Acta Crystallogr. Section D: Biol. Crystallogr.* 1994. Vol. 50(4). P. 469–471.
180. Ferr-D'Amare A. R., Burley S. K. Use of dynamic light scattering to assess crystallizability of macromolecules and macromolecular assemblies // *Structure*. 1994. Vol. 2(5). P. 357–359.
181. Han L., Hyunga S.-J., Ruotolo B. T. Dramatically stabilizing multiprotein complex structure in the absence of bulk water using tuned Hofmeister salts // *Faraday Discuss.* 2013. Vol. 160. P. 371-403.
182. Matthews B. W. Solvent content of protein crystals // *J. Mol. Biol.* 1968. Vol. 33. P. 491–497.
183. Hofmeister F. Zur lehre von der wirkung der salze // *Archiv fur Experimentelle Pathologie und Pharmakologie*. Leipzig, 1888. Vol. 24. S. 247–260.
184. Deller M. C., Kong L., Rupp B. Protein stability: a crystallographer's perspective // *Acta Crystallographica. Sect. F: Structural Biol. Communications*. 2016. Vol. 72 (2). P. 72–95.
185. Davidson M. W., Strzelecka T. E., Rill R. L. Multiple liquid crystal phases of DNA at high concentration // *Nat.* 1988. Vol. 331. P. 457–460.
186. Zhou H. Y., Zhang J., Yan R. L., Wang Q., Fan L. Y., Zhang Q., Wang W. J., Hu Z. Q. Improving the antibacterial property of porcine small intestinal submucosa by nano-silver supplementation: a promising biological material to address the need for contaminated defect repair // *Ann. Surg.* 2011. Vol. 253. P. 1033–1041.
187. Sharma V. K., Yngard R. A., Lin Y. Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities // *Adv. Col. Interf. Sci.* 2009. Vol. 145(1–2). P. 83–96.
188. Yang W., Shen C., Ji Q., An H., Wang J., Liu Q., Zhang Z. Food storage material silver nanoparticles interfere with DNA replication fidelity and bind with DNA // *Nanotechnol.* 2009. Vol. 20(8). P. 085102.

189. Babu K., Deepa M., Shankar S. G., Rai S. Effect of nano-silver on cell division and mitotic chromosomes: a prefatory siren // Internet J. Nanotechnol. 2008. Vol. 2(2). URL: <http://ispub.com/IJNT/2/2/7357> (retrieved 2017-11-01)
190. Sawosz E., Grodzik M., Zielinska M., Niemiec T., Olszanska B., Chwalibog B. Nanoparticles of silver do not affect growth, development and DNA oxidative damage in chicken embryos // Archiv fur Geflugelkunde. 2009. Vol. 73(3). P. 208–213.
191. Asharani P. V., Mun G. L. K., Hande M. P., Valiyaveetil S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells // ACS Nano. 2009. Vol. 3(2). P. 279–290.
192. Wijnhoven S. W. P., Peijnenburg W. J. G. M., Herberts C. A., Hagens W. I., Oomen A. G., Heugens E. H. W., Roszek B., Bisschops J., Gosens I., Van De Meent D., Dekkers S., De Jong W. H., Van Zijverden M., Sips A. J. A. M., Geertsma R. E. Nano-silver – a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment // Nanotoxicol. 2009. Vol. 3. P. 109–138.
193. Sirover M. A., Loeb L. A. Infidelity of DNA synthesis in vitro: screening for potential metal mutagens or carcinogens // Science. 1976. Vol. 194(4272). P. 1434–1436.
194. Андроникашвили Э. Л., Есипова Н. Г. Роль металлов в развитии некоторых опухолевых процессов // Биофизика. 1982. Т. 27, № 6. С. 1022–1024.
195. Семёнов М. А. Гидратация и структурные переходы нуклеиновых кислот в конденсированном состоянии: дис. д-ра физ.-мат. наук : 03.00.02 / МГУ им. Ломоносова. Москва, 1990.
196. Powell J. W., Edwards G. S., Genzel L., Kremer F., Wittlin A., Kubasek W., Peticolas W. Investigation of far-infrared vibrational modes in polynucleotides // Phys. Rev. A. 1987. Vol. 35. P. 3929–3939.

197. Rupprecht A., Forslind B. Variation of electrolyte content in wet-spun lithium- and sodium-DNA // *Biochim. Biophys. Acta*. 1970. Vol. 204. P. 304–316.
198. Пастон С. В., Ушков П. А. Изучение кинетики взаимодействия ДНК с ионами меди // *Вестн. С.-Петербург. гос. ун-т. Сер. 4*. 2014. Т. 1(4). С. 508–512.
199. Nejdli L., Ruttkay-Nedecky B., Kudr J., Krizkova S., Smerkova K., Dostalova S., Vaculovicova M., Kopel P., Zehnalek J., Trnkova L., Babula P., Adam V., Kizek R. DNA interaction with zinc(II) ions // *Intern. J. of Biol. Macromolecules*. 2014. Vol. 64. P. 281–287.
200. Emerit J., Beaumont C., Trivin F. Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury // *Biomed. Pharmacotherapy*. 2001. Vol. 55(6). P. 333–339.
201. Gaetke L. M., Chow C. K. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients // *Toxicology*. 2003. Vol. 189(1–2). P. 147–163.
202. Devesa-Rey R., Bustos G., Cruz J. M., Moldes A. B. Evaluation of non-conventional coagulants to remove turbidity from water // *Water, Air and Soil Pollution*. 2012. Vol. 223. P. 591–598.
203. Ciciliano J. C., Sakurai Y., Myers D. R., Fay M. E., Hechler B., Meeks S., Li R., Dixon J. B., Lyon L. A., Gachet C., Lam W. A. Resolving the multifaceted mechanisms of the ferric chloride thrombosis model using an interdisciplinary microfluidic approach // *Blood*. 2015. Vol. 126(6). P. 817–824.
204. Roosen-Runge F., Heck B. S., Zhang F., Kohlbacher O., Schreiber F. Interplay of pH and binding of multivalent metal ions: charge inversion and reentrant condensation in protein solutions // *J. Phys. Chem. B*. 2013. Vol. 117 (18). P. 5777–5787.
205. Baalousha M., Manciu A., Cumberland S., Kendall K., Lead J. R. Aggregation and surface properties of iron oxide nanoparticles: influence of pH and natural organic matter // *Environ. Toxic. Chem.* 2008. Vol. 27(9). P. 1875–1882.

206. Exley C. The toxicity of aluminium in humans // *Morphologie*. 2016. Vol. 100(329). P. 51–55.
207. Близнюк Ю. Н., Глибицкий Д. М., Семёнов М. А., Шестопалова А. В., Малеев В. Я. Самоассоциация и гидратация флавиномононуклеотида в растворах и плёнках // *Біофіз. вісн.* 2014. Вип. 31(1). С. 5–22.
208. Zhang Y., Görner H. Flavin-sensitized photo-oxidation of lysozyme and serum albumin // *Photochem. Photobiol.* 2009. Vol. 85(4). P. 943–948.
209. Guo X. J., Sun X. D., Xu S. K. Spectroscopic investigation of the interaction between riboflavin and bovine serum albumin // *J. Mol. Struct.* 2009. Vol. 931(1). P. 55–59.
210. Bastian M., Sigel H. The self-association of flavin mononucleotide (FMN²⁻) as determined by ¹H NMR shift measurements // *Biophys. Chem.* 1997. Vol. 67(1–3), P. 27–34.
211. Picó G. Thermodynamic aspects of the thermal stability of human serum albumin // *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1995. Vol. 36. P. 1017–1023.
212. Gaber M. H. Effect of gamma-irradiation on the molecular properties of bovine serum albumin // *J. Biosci. Bioeng.* 2005. Vol. 100. P. 203–206.
213. Borzova V. A., Markossian K. A., Chebotareva N. A., Kleymenov S. Yu., Poliansky N. B., Muranov K. O., Stein-Margolina V. A., Shubin V. V., Markov D. I., Kurganov B. I. Kinetics of thermal denaturation and aggregation of bovine serum albumin // *PLoS One*. 2016. Vol. 11(4). URL: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0153495> (retrieved 2017-09-12).
214. Семенов М.О., Малеев В.Я. ІЧ-спектроскопічне дослідження термостійкості альбуміну при різних ступенях його іонізації // *Доповіді Академії наук УРСР. Сер. Б.* 1972. № 12. С. 1095–1097.
215. Gorobchenko O. A., Nikolov O. T., Nardid O. A. Examination of γ -irradiation influence on bovine serum albumin by the method of spin traps // *Appl. Radio Electron.* 2004. Vol. 3. P. 102–104.

216. Gorobchenko O. A., Nikolov O. T., Gatash S. V. Conformation transitions of blood proteins under influence of physical factors on microwave dielectric method // J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf. 2006. Vol. 102. P. 18–24.
217. Lee S., Lee S., Song K. B. Effect of gamma-irradiation on the physicochemical properties of porcine and bovine blood plasma proteins // Food Chem. 2003. Vol. 82. P. 521–526.
218. Erickson H. P. Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy // Biol. Proced. Online. 2009. Vol. 11. P. 32–51.
219. Silverman B. W. Density estimation for statistics and data analysis. London: Chapman and Hall, 1986. 176 p. (Monographs on Statistics and Applied Probability; vol. 26).
220. Kruskal W. H., Wallis W. A. Use of ranks in one-criterion variance analysis // J. Amer. Stat. Assoc. 1952. Vol. 47(260). P. 583–621.
221. Mann H. B., Whitney D. R. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other // Ann. Math. Stat. 1947. Vol. 18(1). P. 50–60.
222. Conover W. J. Iman R. L. On multiple-comparisons procedures: report / Los Alamos Scientific Laboratory. Los Alamos (USA). 1979. URL: <http://permalink.lanl.gov/object/tr?what=info:lanl-repo/lareport/LA-07677-MS> (retrieved 2016-10-28).
223. Holm S. A simple sequentially rejective multiple test procedure // Scandinavian J. Stat. 1979. Vol. 6(2). P. 65–70.

ДОДАТОК 1

Список публікацій здобувача за темою дисертації

Публікації у закордонних наукових фахових виданнях:

1. Glibitskiy G. M., **Glibitskiy D. M.**, Gorobchenko O. A., Nikolov O. T., Roshal A. D., Semenov M. A., Gasan A. I. Textures on the surface of BSA films with different concentrations of sodium halides and water state in solution // Nanoscale Res. Lett. 2015. Vol. 10(1). Article ID 155. DOI: 10.1186/s11671-015-0860-0 (*Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі літературних даних, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні статті*) (Видання входить до міжнародних наукометричних баз Web of Science і Scopus)
2. **Glibitskiy D. M.**, Gorobchenko O. A., Nikolov O. T., Cheipesh T. A., Roshal A. D., Zibarov A. M., Shestopalova A. V., Semenov M. A., Glibitskiy G. M. Effect of gamma-irradiation of bovine serum albumin solution on the formation of zigzag film textures // Rad. Phys. Chem. 2018. Vol. 144. P. 231–237. DOI: 10.1016/j.radphyschem.2017.08.019 (*Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі літературних даних, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні статті*) (Видання входить до міжнародних наукометричних баз Web of Science і Scopus)

Публікації у наукових фахових виданнях України:

3. Глибицкий Г. М., Семенов М. А., **Глибицкий Д. М.** Текстуры пленок Na-DNA, полученные из растворов, содержащих ТРИС и ЭДТА // Біофіз. вісн. 2011. Вип. 27(2). С. 26–30. (*Особистий внесок здобувача: участь у*

формулюванні задач дослідження, аналізі літературних даних, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні статті)

4. Glibitskiy G. M., Jelali V. V., Semenov M. O., Roshal A. D., **Glibitskiy D. M.**, Volyanskiy O. Yu., Zegrya G. G. Interaction of DNA with Silver Nanoparticles // Ukr. J. Phys. 2012. Vol. 57(7). P. 695–699. (*Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі літературних даних, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні статті*) (Видання входить до міжнародних наукометричних баз Web of Science і Scopus)
5. **Glibitskiy D. M.**, Glibitskiy G. M., Semenov M. A., Shestopalova A. V. Textures of BSA films with iron and copper ions // Biophys. Bull. 2016. Vol. 35(1). P. 21–27. (*Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі літературних даних, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні статті*)
6. **Glibitskiy D. M.**, Gorobchenko O. A., Nikolov O. T., Shestopalova A. V., Semenov M. A. Characterization of zigzag patterns on the surface of bovine serum albumin films // Biophys. Bull. 2017. Vol. 37(1). P. 16–29. DOI: 10.26565/2075-3810-2017-37-03 (*Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі літературних даних, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні статті*)
7. **Glibitskiy D. M.** Modeling of protein and salt redistribution during drying of a solution from a square cell // Biophys. Bull. 2018. Vol. 39(1). P. 55–74. DOI: 10.26565/2075-3810-2018-39-05

Публікації апробаційного характеру (тези доповідей на наукових конференціях) за темою дисертації:

8. **Glibitskiy D. M.**, Glibitskiy G. M., Gorobchenko O. O., Nikolov O. T., Semenov M. A. Textures of BSA films with sodium halides // Nanotechnology and nanomaterials : abstr. Intern. research and practice conf., 23–30 Aug. 2014. Yaremche-Lviv, 2014. P. 538. *(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі літературних даних, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні тези)*
9. Glibitskiy G. M., **Glibitskiy D. M.**, Gorobchenko O. A., Nikolov O. T., Roshal A. D., Semenov M. A. Properties of films of bovine serum albumin with sodium halides // Nanobiophysics 2015: Fundamental and Applied Aspects : abstr. IV Intern. Conf., 1–4 Oct. 2015. Kyiv, 2015. P. 44. *(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі літературних даних, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні тези)*
10. Gorobchenko O. A., Nikolov O. T., **Glibitskiy D. M.**, Roshal A. D., Shestopalova A. V., Semenov M. A., Glibitskiy G. M. Effect of gamma irradiation of protein solution on the formation of film textures // Nanotechnology and nanomaterials : abstr. Intern. research and practice conf., 26–29 Aug. 2015. Lviv, 2015. P. 386. *(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі літературних даних, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні тези)*
11. **Glibitskiy D. M.**, Gorobchenko O. A., Nikolov O. T., Zibarov A. M., Roshal A. D., Semenov M. A., Glibitskiy G. M. Effect of flavin mononucleotide on the texture of BSA films // Nanotechnology and nanomaterials : abstr. Intern. research and practice conf., 24–27 Aug. 2016. Lviv, 2016. P. 132. *(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні*

задач дослідження, аналізі літературних даних, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні тези)

12. **Glibitskiy D. M.**, Zibarov A. M. Effect of Fe(III) on BSA and its film textures // Applied Physics and Engineering : abstr. 2nd Intern. Young Scientists Forum, 10–16 Oct. 2016. Kharkiv, 2016. 1 electronic optical disc (CD-ROM). (*Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі літературних даних, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні тези*)
13. **Glibitskiy D. M.**, Gorobchenko O. A., Zibarov A. M., Cheipesh T. A., Nikolov O. T., Roshal A. D., Semenov M. A., Glibitskiy G. M. Zigzag patterns on the surface of BSA+AlCl₃ films // Nanotechnology and Nanomaterials (NANO-2017) : abstr. Intern. research and practice conf., 23–26 Aug. 2017. Chernivtsi, 2017. P. 601. (*Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі літературних даних, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні тези*)
14. **Glibitskiy D. M.**, Cheipesh T. A., Gorobchenko O. A., Zibarov A. M., Nikolov O. T., Roshal A. D., Semenov M. A., Glibitskiy G. M. Comparison of spectral, light scattering and zigzag pattern analysis methods // Nanotechnology and Nanomaterials (NANO-2017) : abstr. Intern. research and practice conf., 23–26 Aug. 2017. Chernivtsi, 2017. P. 602. (*Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі літературних даних, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні тези*)
15. **Glibitskiy D. M.**, Gorobchenko O. A., Zibarov A. M., Cheipesh T. A., Nikolov O. T., Roshal A. D., Semenov M. A., Glibitskiy G. M. Dynamic light scattering, spectral and zigzag pattern analysis of solutions and films of BSA with FeCl₃ // NANOBIOPHYSICS: Fundamental and Applied Aspects (NBP-2017) : abstr. 5th Intern. Conf., 2–5 Oct. 2017. Kharkiv, 2017. P. 60.

(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі літературних даних, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні тези)

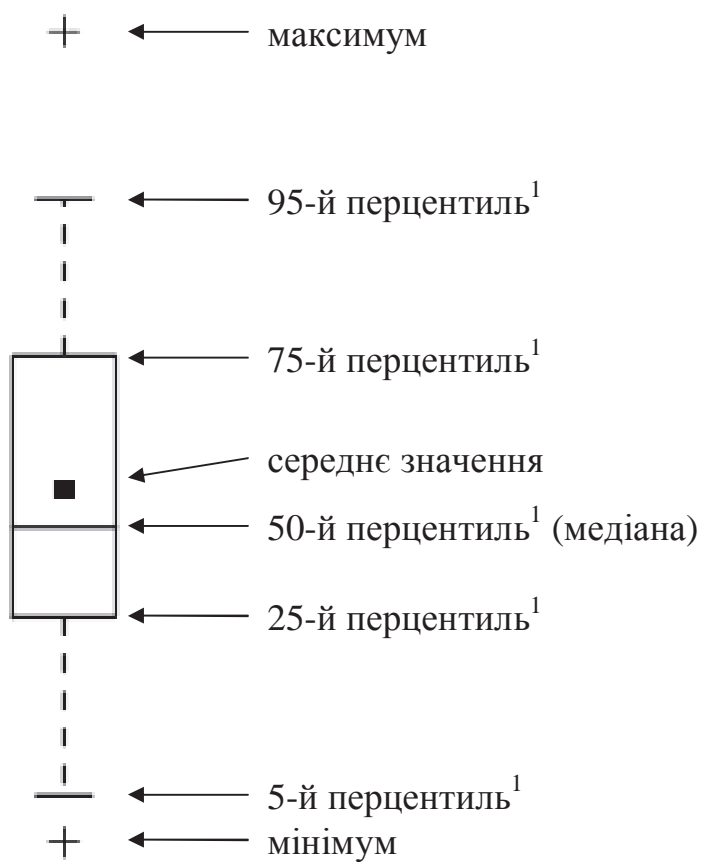
16. **Glibitskiy D.** Modeling of particle redistribution in protein-salt solution evaporating from a square cell // Abstr. 1st Intern. Symp. on Mechanics, 9–12 July 2018. Aberdeen (UK), 2018. URL: https://conferences-nscj.co.uk/abstract/files/10/abstract/me01_A0878.pdf (retrieved 2018-03-25).
17. **Glibitskiy D.**, Gorobchenko O., Nikolov O., Cheipesh T., Roshal A., Zibarov A., Semenov M., Glibitskiy G. Statistical differences of zigzag patterns on films obtained from gamma irradiated BSA solutions // Abstr. 1st Intern. Symp. on Mechanics, 9–12 July 2018. Aberdeen (UK), 2018. URL: https://conferences-nscj.co.uk/abstract/files/10/abstract/me01_A0877.pdf (retrieved 2018-03-25). *(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі літературних даних, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні тези)*

Публікації, які додатково відображають наукові результати дисертації:

18. Спосіб визначення впливу речовини на біополімери : пат. на винахід №110130 Україна / Глибицький Г. М., **Глибицький Д. М.** ; Ін-т радіофізики та електроніки імені О. Я. Усикова НАН України. № а2013 12 123 ; заявлено 16.10.2013 ; опубл. 25.11 2015, Бюл. № 22. *(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі літературних даних, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні патенту)*

ДОДАТОК 2

Позначення коробкових графіків



1

¹ Перцентиль – значення, яке задана випадкова величина не перевищує з фіксованою ймовірністю. Наприклад, 25-й перцентиль змінної x — це таке значення x_p , що 25% значень змінної x менше значення x_p .